

Surfactantproteine bei Pulmonaler Alveolarproteinose

Christian Peter Paschen

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Professor Dr. med. D. Reinhardt

Surfactantproteine bei Pulmonaler Alveolarproteinose



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Peter Paschen

aus
München
2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Giese
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. D. Rapaport Prof. Dr. Dr. K.-S. Boos
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	21. 12. 2004

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	10
I. EINLEITUNG	12
I.A Zusammensetzung und physiologische Rolle von Surfactant	12
I.B Struktur und Funktion der Surfactantproteine und Phospholipide	12
I.C Pulmonale Alveolarproteinose.....	18
I.D Fragestellungen und Ziele der Arbeit	18
II. MATERIAL UND METHODEN	21
II.A Patienten und gesunde Kontrollgruppen.....	21
II.B Probengewinnung durch BAL und zytologische Beurteilung	22
II.C Quantitative Proteinbestimmung	24
II.D Lipidextraktion	25
II.E Quantitative Phospholipidbestimmung.....	26
II.F Enzyme-linked Immunosorbent Assay	28
II.F.1 <i>Quantitative SP-A Bestimmung</i>	30
II.F.2 <i>Quantitative SP-D Bestimmung</i>	32
II.G 1D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse.....	34
II.H 2D Gelelektrophorese und Westernblotting	38
II.I Kapillarsurfactometer	43
II.J HPLC	46
II.K Statistische Auswertung.....	48
III. ERGEBNISSE	50
III.A THERAPEUTISCHE HALBLUNGENLAVAGEN.....	50
III.A.1 <i>Gesamtgehaltsanalyse</i>	50
III.A.1.1 Protein.....	50
III.A.1.1.1 Konzentration.....	50
III.A.1.1.2 Gesamtmenge.....	54
III.A.1.2 Phospholipide.....	60
III.A.1.2.1 Konzentration.....	60
III.A.1.2.2 Gesamtmenge.....	64
III.A.1.3 SP-A.....	70
III.A.1.3.1 Konzentration.....	70
III.A.1.3.2 Gesamtmenge.....	74
III.A.1.4 SP-D.....	80
III.A.1.4.1 Konzentration.....	80
III.A.1.4.2 Gesamtmenge.....	84
III.A.2 <i>Auswaschkinetik</i>	90
III.A.2.1 Protein.....	90
III.A.2.1.1 Konzentration.....	90
III.A.2.1.1.1 Juvenile Patienten	90
III.A.2.1.1.2 Adulte Patienten.....	92
III.A.2.1.1.3 Cholesterolpneumonitis	93

III.A.2.1.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	94
III.A.2.1.2.1	Juvenile Patienten	94
III.A.2.1.2.2	Adulte Patienten.....	96
III.A.2.1.2.3	Cholesterolpneumonitis	98
III.A.2.1.3	Protein % Gesamt.....	99
III.A.2.1.3.1	Juvenile Patienten	99
III.A.2.1.3.2	Adulte Patienten.....	101
III.A.2.1.3.3	Cholesterolpneumonitis	102
III.A.2.2	Phospholipide.....	104
III.A.2.2.1	Konzentration.....	104
III.A.2.2.1.1	Juvenile Patienten	104
III.A.2.2.1.2	Adulte Patienten.....	106
III.A.2.2.1.3	Cholesterolpneumonitis	107
III.A.2.2.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	107
III.A.2.2.2.1	Juvenile Patienten	107
III.A.2.2.2.2	Adulte Patienten.....	110
III.A.2.2.2.3	Cholesterolpneumonitis	111
III.A.2.2.3	Phospholipid % Gesamt.....	112
III.A.2.2.3.1	Juvenile Patienten	112
III.A.2.2.3.2	Adulte Patienten.....	114
III.A.2.2.3.3	Cholesterolpneumonitis	115
III.A.2.3	SP-A	116
III.A.2.3.1	Konzentration.....	116
III.A.2.3.1.1	Juvenile Patienten	116
III.A.2.3.1.2	Adulte Patienten.....	118
III.A.2.3.1.3	Cholesterolpneumonitis	118
III.A.2.3.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	118
III.A.2.3.2.1	Juvenile Patienten	118
III.A.2.3.2.2	Adulte Patienten.....	121
III.A.2.3.2.3	Cholesterolpneumonitis	121
III.A.2.3.3	SP-A % Gesamt	122
III.A.2.3.3.1	Juvenile Patienten	122
III.A.2.3.3.2	Adulte Patienten.....	124
III.A.2.3.3.3	Cholesterolpneumonitis	124
III.A.2.4	SP-D	125
III.A.2.4.1	Konzentration.....	125
III.A.2.4.1.1	Juvenile Patienten	125
III.A.2.4.1.2	Adulte Patienten.....	127
III.A.2.4.1.3	Cholesterolpneumonitis	127
III.A.2.4.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	127
III.A.2.4.2.1	Juvenile Patienten	127
III.A.2.4.2.2	Adulte Patienten.....	130
III.A.2.4.2.3	Cholesterolpneumonitis	130
III.A.2.4.3	SP-D % Gesamt	131
III.A.2.4.3.1	Juvenile Patienten	131
III.A.2.4.3.2	Adulte Patienten.....	133
III.A.2.4.3.3	Cholesterolpneumonitis	133
III.A.2.5	SP-C mittels 1D Gelelektrophorese und Immunoblot bei Patient J01	134
III.A.2.5.1	Reduzierte Form.....	134
III.A.2.5.2	Nicht – reduzierte Form	135

III.A.2.6	Pro SP-C mittels 1D Gelelektrophorese und Immunoblot bei Patient J01	136
III.A.2.6.1	Reduzierte Form.....	136
III.A.2.6.2	Nicht – reduzierte Form	138
III.A.2.7	Gesamtauswaschcharakteristik mittels 2D Gelelektrophorese über Silberfärbung	140
III.A.2.7.1	Patient J01	140
III.A.2.7.2	Patient J02	148
 III.B HALBLUNGENLAVAGEN BEI PERFLUORCARBON-SPÜLUNG.....		155
III.B.1	<i>Gesamtgehaltsanalyse</i>	<i>155</i>
III.B.1.1	Protein.....	155
III.B.1.1.1	Konzentration.....	155
III.B.1.1.2	Gesamtmenge.....	156
III.B.1.2	Phospholipide.....	156
III.B.1.2.1	Konzentration.....	156
III.B.1.2.2	Gesamtmenge.....	157
III.B.2	<i>Auswaschkinetik.....</i>	<i>158</i>
III.B.2.1	Protein.....	158
III.B.2.1.1	Konzentration.....	158
III.B.2.1.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	159
III.B.2.1.3	Protein % Gesamt.....	160
III.B.2.2	Phospholipide.....	162
III.B.2.2.1	Konzentration.....	162
III.B.2.2.2	Gesamtmenge je 500 ml Portion.....	163
III.B.2.2.3	Phospholipid % Gesamt.....	164
 III.C BIOPHYSIKALISCHE FUNKTIONEN		167
III.C.1	<i>Pool.....</i>	<i>167</i>
III.C.1.1	%open	167
III.C.1.2	Initial pressure.....	168
III.C.2	<i>Verlauf während der Lavage</i>	<i>169</i>
III.C.2.1	%open	169
III.C.2.2	Initial pressure.....	169
III.C.2.3	Korrelation %open zu initial pressure	170
 III.D ERARBEITUNG EINER MONITORING-METHODE FÜR DIE AUSWASCHEFFIZIENZ EINER LAVAGE.....		172
III.D.1	<i>Bestimmung der geeigneten Wellenlänge.....</i>	<i>172</i>
III.D.2	<i>Auswaschkinetik gemessen als optische Dichte.....</i>	<i>175</i>
III.D.3	<i>Zusammenhang zwischen der Absorption und einzelner Surfactantparameter</i>	<i>179</i>
III.D.3.1	Protein.....	179
III.D.3.2	Phospholipid	181

III.D.3.3	SP-A	183
III.D.3.4	SP-D	185
III.D.4	Validierung der Methode	187

III.E WEITERGEHENDE BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EINZELNER PATIENTEN..... 193

III.E.1	Patient J01	193
III.E.1.1	Charakterisierung der Surfactantproteine mittels 1D Gelelektrophorese	193
III.E.1.1.1	SP-A	193
III.E.1.1.2	SP-B	194
III.E.1.1.3	Pro SP-B.....	195
III.E.1.1.4	SP-C	196
III.E.1.1.5	Pro SP-C (Beers).....	197
III.E.1.1.6	Pro SP-C (Whitsett)	198
III.E.1.1.7	SP-D	199
III.E.1.2	Charakterisierung der Surfactantproteine mittels 2D Gelelektrophorese	200
III.E.1.2.1	Identifizierung einzelner Spots mittels Massenspektrometrie	200
III.E.1.2.2	SP-A	202
III.E.1.2.3	Pro SP-B.....	203
III.E.1.2.4	SP-B	204
III.E.1.2.5	Pro SP-C (Beers).....	205
III.E.1.2.6	Pro SP-C (Whitsett)	206
III.E.1.2.7	SP-C	207
III.E.1.2.8	SP-D	208
III.E.1.2.9	Zweiter Antikörper (goat α rabbit).....	209
III.E.1.3	Glycosilierungsmuster	210
III.E.1.3.1	N – Deglycosidase	210
III.E.1.3.1.1	Pro SP-C.....	210
III.E.1.3.1.2	Pro SP-B.....	210
III.E.1.3.2	O – Deglycosidase	213
III.E.1.3.2.1	Pro SP-C.....	213
III.E.2	Patient J02	214
III.E.2.1	Glycosilierungsmuster	214
III.E.2.1.1	N – Deglycosidase	214
III.E.2.1.1.1	Pro SP-C.....	214
III.E.2.1.1.2	Pro SP-B.....	215

III.F VARIABILITÄT DER SURFACTANTPROTEINE ÜBER DIE ZEIT..... 217

III.F.1	Patient J01	217
III.F.1.1	Variabilität des SP-C über die Zeit	217
III.F.1.2	Variabilität des Pro SP-C über die Zeit	218
III.F.1.3	Variabilität der Surfactantbestandteile über die Zeit	222

III.F.2	<i>Patient J02</i>	225
III.F.2.1	Variabilität der Surfactantbestandteile über die Zeit	225
 III.G ERARBEITUNG EINER BESTIMMUNGSMETHODE FÜR SP-B MITTELS HPLC		229
III.G.1	<i>Extraktionsmethode</i>	229
III.G.1.1	Native Auftragung	229
III.G.1.2	Methode nach Bligh Dyer	230
III.G.1.3	Neue Extraktionsmethode	231
III.G.2	<i>Optimierung der Trennung</i>	232
III.G.2.1	Fließmittel	232
III.G.2.2	Säulentemperatur	234
III.G.3	<i>Überprüfung der Trennung</i>	235
III.G.4	<i>Eichgerade</i>	237
III.G.5	<i>Validierung</i>	239
III.G.5.1	Präzision	239
III.G.5.2	Bestimmungsgrenze	240
III.G.5.3	Nachweisgrenze	240
 IV. DISKUSSION		241
IV.A	Therapeutische Halblungenlavagen	241
IV.A.1	Gesamtgehaltsanalyse	241
IV.A.1.1	Protein	241
IV.A.1.2	Phospholipide	242
IV.A.1.3	SP-A	242
IV.A.1.4	SP-D	243
IV.A.2	Auswaschkinetik	243
IV.B	Halblungenlavagen bei Perfluorcarboneinspülung	244
IV.C	Biophysikalische Funktionen	245
IV.D	Erarbeitung einer Monitoringmethode für die Auswascheffizienz	246
IV.E	Weitergehende biochemische Charakterisierung einzelner Patienten	247
IV.F	Variabilität der Surfactantproteine über die Zeit	248
IV.G	Erarbeitung einer Bestimmungsmethode für SP-B mittels HPLC	250
 V. ZUSAMMENFASSUNG		251
 VI. ANHANG		253
VI.A	Literaturverzeichnis	253
VI.B	Tabellen	260
VI.C	Danksagung	311
VI.D	Lebenslauf	312

Abkürzungsverzeichnis

%open	Öffnungszeit der Kapillare
°C	Grad Celsius
1D SDS Page	Eindimensionale Sodiumdocecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
2D SDS Page	Zweidimensionale Sodiumdocecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
ABTS	2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinesulfonate(6)] diammoniumsalz
AUC	Area under the curve
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serumalbumin
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DTT	Dithiothreitol
ECMO	Extracorporale Membranoxygenierung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen - Kolonien stimulierende Faktoren
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IEP	Isoelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin G
IL3	Interleukin 3
IL5	Interleukin 5
kDa	Kilodalton
LA	Large Aggregates
LDH	Laktatdehydrogenase
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification

MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minuten
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
PAP	Pulmonale Alveolarproteinose
PBS	Phosphate buffered saline
PFC	Perfluorcarbon
ROC	Responder Operator Curve
RSD	Relative Standardabweichung
s.c.	subkutan
SA	Small Aggregates
SEM	Standard Error of Mean
SFTPb	Surfactantprotein B
SFTPC	Surfactantprotein C
SP-A	Surfactantprotein A
SP-B	Surfactantprotein B
SP-C	Surfactantprotein C
SP-D	Surfactantprotein D
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolett

I. Einleitung

I.A. Zusammensetzung und physiologische Rolle von Surfactant

Pulmonales Surfactant ist ein homogenes Gemisch aus Proteinen, Phospholipiden und neutralen Lipiden.²² Surfactant befindet sich in dem Flüssigkeitsfilm, der die Oberfläche des Alveolarraumes der Lunge benetzt, und seine physiologische Aufgabe besteht vor allem in der Senkung der Oberflächenspannung und der daraus resultierenden Stabilisierung der Alveolen während der Atmung. Diese oberflächenaktive Wirkung beruht hauptsächlich auf der amphiphilen Struktur der Phospholipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylglycerol. Surfactant gewährleistet eine ausreichende Oxygenierung bei gleichzeitiger Senkung der Atemarbeit.^{35;62} Zudem ist Surfactant - insbesondere mit den Surfactantproteinen A und D - an der lokalen Immunmodulation und pulmonalen Infektabwehr beteiligt.⁶²

I.B. Struktur und Funktion der Surfactantproteine und Phospholipide

Eine bronchoalveoläre Lavage besteht zu 90% aus Lipiden und hat einen Proteinanteil von etwa 10%.

Nur etwa die Hälfte der Proteine sind spezifische Surfactantproteine, der Rest sind Plasmaproteine.²² Bisher sind vier surfactantspezifische Proteine beschrieben worden: SP-A, SP-B, SP-C und SP-D.

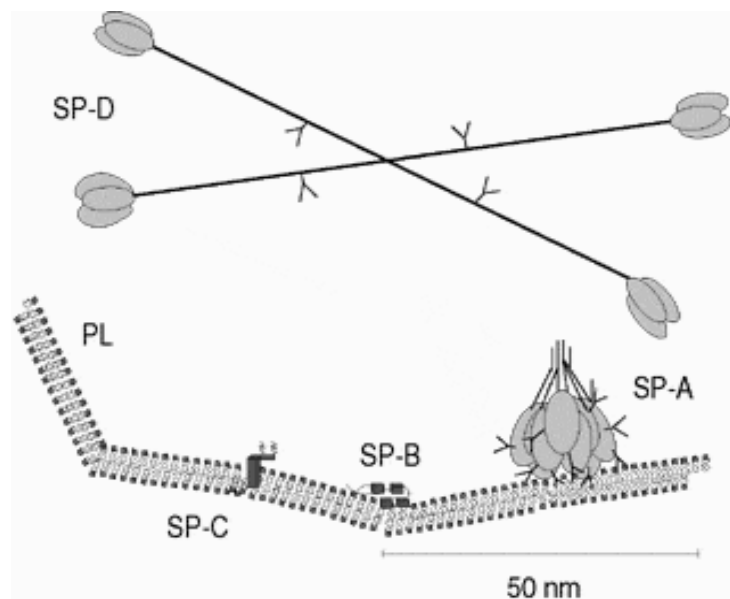


Abbildung I.B.1.: Surfactantproteine und Phospholipide in der bronchoalveolären Lavage²²

Surfactantprotein A (SP-A) ist ein hydrophiles Glycoprotein mit einer Größe von 28 - 36 Kilodalton, welches sowohl an der Regulation des Surfactantstoffwechsels beteiligt ist^{35;62}, als auch die Inaktivierung von Surfactant verhindert.⁶² Des Weiteren beschleunigt SP-A die Ausrichtung der Phospholipide an der Luft - Wasser - Grenzfläche und stimuliert die Immunabwehr durch die Makrophagen.⁸⁵ Das zur

Gruppe der Collectine gehörende Protein geht mittels seiner Lektindomäne oder Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-domain, CRD) kalziumabhängige Bindungen mit Kohlenhydratoberflächen ein¹³ und bindet so Krankheitserreger, die dann als Agglutinate besser durch die mukoziliäre Clearance entfernt werden können.⁴⁷ Menschliches SP-A ist ein Oligopeptid aus 228 Aminosäuren. Am C-terminalen Ende befindet sich der Bereich der Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-region, CRD), gefolgt von einer kurzen Verbindungsdomäne (neck region), einer langen collagenähnlichen Region (collagenous-domain) und schließlich einer kurzen N-terminalen, glycinreichen Disulfid-Domäne (Aminoterminal). Seine einzelnen Ketten sind in trimeren Untereinheiten zusammengefasst, welche wiederum über die Disulfidbrücken am N-terminalen Ende zu Oktadecameren verknüpft sind.⁴

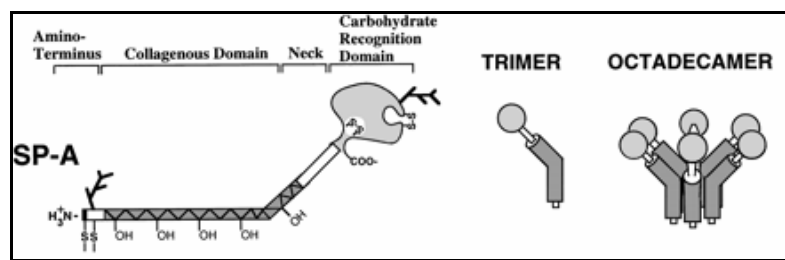
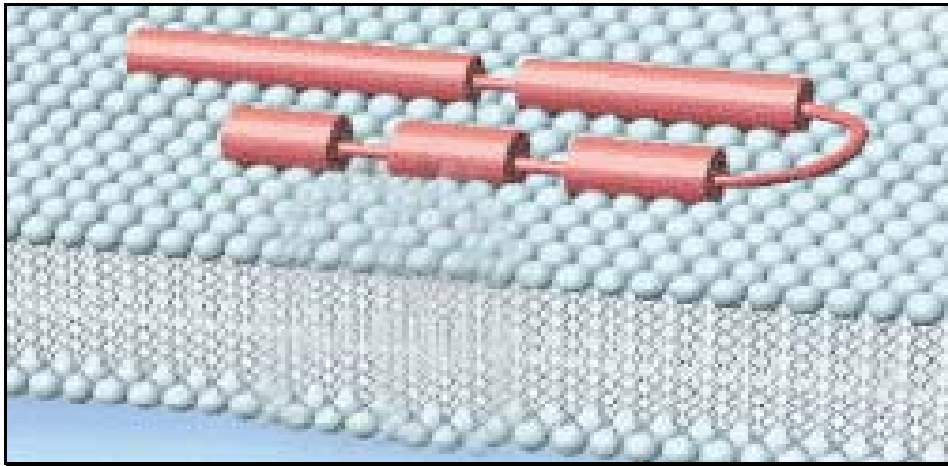
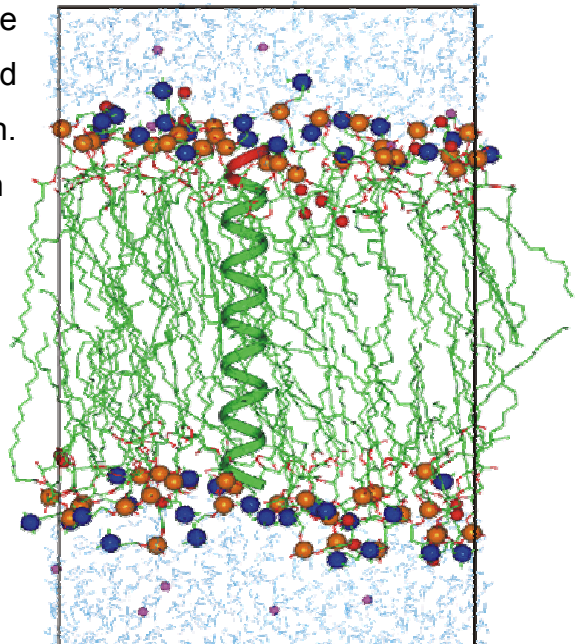


Abbildung I.B.2.: Surfactantprotein A⁴⁴

Surfactantprotein B (SP-B) ist ein hydrophobes, bei physiologischem pH positiv geladenes Molekül mit einer Größe von etwa 8 Kilodalton. Seine Hauptaufgabe besteht darin, die Formierung eines oberflächenaktiven Filmes zu beschleunigen, indem es die Adsorption der Lipide um den Faktor >150 erhöht.²² Darüber hinaus spielt SP-B eine große Rolle bei der Bildung und Speicherung des Surfactants. Unter anderem ist es für die korrekte Lagerung der Phospholipide in Form von konzentrischen Lamellen in den Lammellarkörperchen verantwortlich.⁷⁴ Das zur Gruppe der Saposine gehörende Protein besteht aus 79 Aminosäuren, von denen 52% hydrophob sind. Dieser lipophile Charakter führt dazu, dass es immer mit Phospholipiden vergesellschaftet vorkommt. SP-B liegt meistens als Dimer vor. Die Monomere besitzen α -helikale Strukturen und sind über sechs Disulfidbrücken verknüpft.⁸³

Abbildung I.B.3.: Surfactantprotein B⁵⁸

Surfactantprotein C (SP-C) ist ein sehr hydrophobes Polypeptid, mit einer Größe von 4 Kilodalton. Wie auch SP-B stabilisiert es die Oberflächenaktivität des Surfactantfilms während der Kompression und Expansion durch das Atmen. Auch erhöht es die Aufnahme der Phospholipide in Typ II Pneumocyten.^{22;83} Das Lipopeptid enthält 35 Aminosäuren, von denen 69% hydrophob sind. Die daraus resultierende Gesamthydrophobizität wird durch die doppelte Palmitoylierung noch verstärkt.⁸³ Der mittlere, stark hydrophobe Teil des Proteins bildet eine die Phospholipid Doppelmembran durchspannende α - Helix.^{36;75}

Abbildung I.B.4.: Surfactantprotein C⁵²

Surfactantprotein D (SP-D) ist ein hydrophiles, der Struktur von SP-A sehr ähnliches Polypeptid mit einem Molekulargewicht von ca. 43 Kilodalton.²² Es gehört ebenfalls der Gruppe der Collectine an, nur ist seine collagene Bindungsstelle viel größer und mit einer viel kürzeren Verbindungsregion mit der CRD Domäne verknüpft.¹³ Am C-terminalen Ende befindet sich der Bereich der Kohlenhydratbindungsstelle (carbohydrate-recognition-region, CRD), gefolgt von einer sehr kurzen Verbindungsdomäne (neck region), einer langen collagenähnlichen Region (collagenous-domain) und schließlich einer kurzen N-terminalen, glycinreichen Disulfid-Domäne (Aminotermus). Das in nativen Lavagen gefundene SP-D besteht

aus 12 Monomeren, von denen wieder jeweils drei zu einem Trimer formiert sind. Vier Trimere bilden schließlich eine kreuzähnliche Gestalt. Diese Formation kann an Oberflächenstrukturen von Bakterien und Zellen und unabhängig von der CRD Region auch über einen speziellen Rezeptor an Alveolarmakrophagen binden.³² SP-D hat vor allem immunologische Funktionen. Über seine biophysikalischen Funktionen ist wenig bekannt.

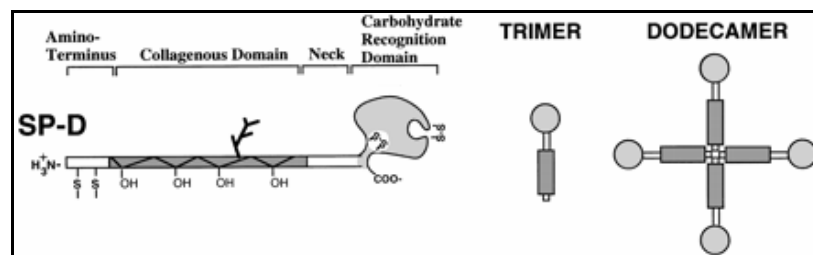


Abbildung I.B.5.: Surfactantprotein D⁷¹

Der *Lipidanteil* des Surfactants einer bronchoalveolären Lavage besteht zu etwa 90% aus Phospholipiden, zu 10% aus Cholesterin und zu einem sehr geringen Teil aus Triglyceriden. Die Hauptkomponente (70-80%) der Phospholipide ist das Phosphatidylcholin, wovon ungefähr die Hälfte bis zwei Drittel in gesättigter Form als Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) vorliegt. DPPC adsorbiert alleine nur sehr langsam an die Luft-Wasser-Grenzfläche. Calcium und die Surfactantproteine A,B und C beschleunigen die Ausbildung des oberflächenaktiven Surfactantfilms erheblich.³⁵ Das zweithäufigste Phospholipid ist mit 10% Phosphatidylglycerol. In geringeren Anteilen kommen Phosphatidylinositol, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin und Sphingomyelin vor.

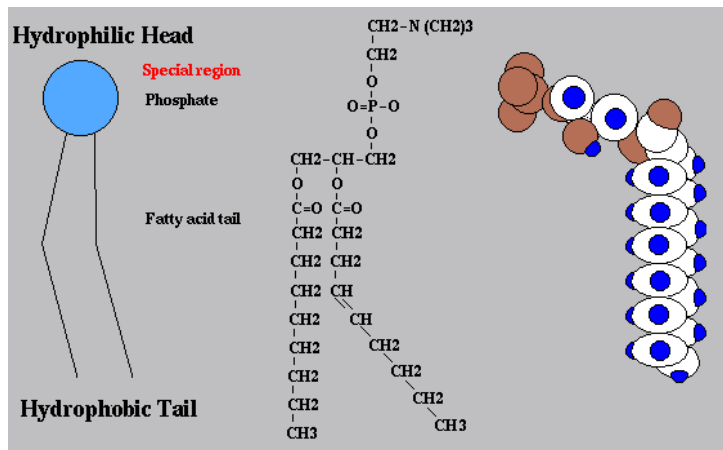


Abbildung I.B.6.: Phospholipide

Typ-II-Pneumocyten sind der Ort der Surfactanthomöostase. Neben den auf den Gasaustausch spezialisierten, flachen, weit ausgedehnten Typ-I-Zellen kleiden sie als Epithelzellen etwa 10% der Oberfläche der Alveolen aus.⁵¹ Sie sind weit größer als Typ-I-Zellen, von kubischer Gestalt und befinden sich vorzugsweise in den Ecken

der Alveolarwände. Ihr typisches Strukturmerkmal sind Lamellenkörperchen, die Speicherorganellen für Surfactant.¹⁰ Die *Synthese* der Surfactantproteine geschieht im endoplasmatischen Reticulum der Typ-II-Pneumozyten. Anschließend werden sie am Golgi - Apparat und an multivesiculären Körperchen modifiziert und dann intrazellulär in Form von Lamellenkörperchen gespeichert. Die Lamellenkörperchen sind in mehreren Lipidschichten um den proteinreichen Kern angeordnet und stellen die charakteristischen Speicherorganellen für Surfactant dar. Sie werden durch Exocytose in die wässrige Subphase, die den Alveolarraum auskleidet, sezerniert. Die Sekretion wird vor allem über die Atemfrequenz und verschiedenen Agonisten an β -adrenergen und Vasopressinrezeptoren gesteuert.²⁴ Im Alveolarraum bildet das Surfactant zunächst tubuläres Myelin, eine Struktur aus gitterförmig angeordneten Röhrchen. Seine Ausbildung benötigt Phospholipide, Kalzium, SP-A und SP-B. Dieses tubuläre Myelin hat die Fähigkeit, sehr schnell eine monomolekulare Phospholipid Grenzschicht zwischen Luft und Wasser

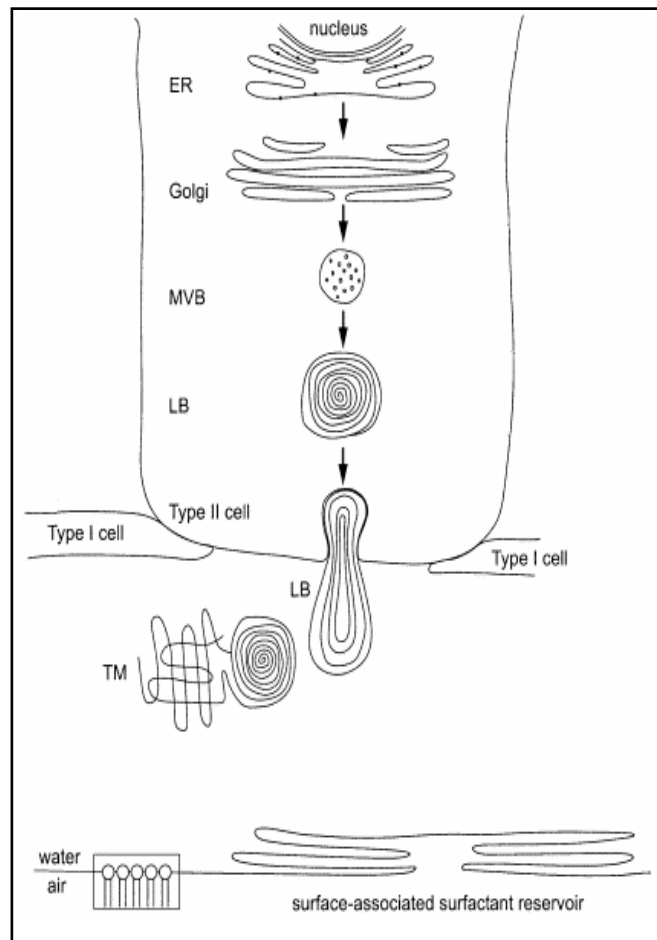


Abbildung I.B.7.: Surfactantmetabolismus⁷⁵

auszubilden.⁷⁹ Dabei interagieren ihre polaren Kopfgruppen mit der wässrigen Phase, während die hydrophoben Acylketten in die Luftumgebung gerichtet sind. DPPC, als Hauptbestandteil dieser Grenzschicht, liegt im festen Aggregatzustand vor und widersteht so den starken Kompressionskräften während der Expiration.⁷⁹ Mono- und mulivesikuläres Surfactant liegt gelöst in der wässrigen Phase vor. Bei Kompression während der Atmung wird DPPC aus der Grenzschicht gedrückt (squeeze out), um die Oberflächenspannung noch mehr zu reduzieren. Der Abbau des Surfactants geschieht über zwei verschiedene Wege: Zum einen wird Surfactant von Alveolarmakrophagen phagozytiert, zum anderen nehmen die Typ-II-Pneumozyten das als kleine Vesikel vorliegende Surfactant wieder auf. Diese

Wiederaufnahme wird durch sämtliche Surfactantproteine und Calcium gefördert.^{23;37} Nach der Wiederaufnahme in die Typ-II-Pneumozyten wird das Surfactant entweder abgebaut und dessen Bestandteile zur Resynthese genutzt, oder die Phospholipide werden bis zur erneuten Sezernierung in den Lamellenkörperchen gespeichert.⁷⁹ Ein kleiner Teil von verbrauchtem Surfactant wird über die Atemwege nach oben und schließlich in den Magen-Darm-Trakt abtransportiert.⁸⁶

I.C. Pulmonale Alveolarproteinose

Bei der pulmonalen Alveolarproteinose (PAP) handelt es sich um eine ungewöhnliche diffuse Lungenerkrankung, die durch die Anhäufung großer Mengen phospholipid- und proteinhaltiger Materialien in den Alveolen der Lungen gekennzeichnet ist. Die pathogenetische Ursache dieser Erkrankung ist eine Störung der Surfactanthomöostase, d.h. Imbalance von sezerniertem und wieder aus dem Alveolarraum beseitigtem Surfactantmaterial. Da dieses Ungleichgewicht eine Folge von sehr vielen unterschiedlichen Pathomechanismen sein kann, macht die große klinische Variabilität hinsichtlich Präsentation und Verlauf verständlich und erklärt, dass die PAP nur als klinischer Phänotyp aufzufassen ist.²⁵

PAP ist mit etwa 1 Erkrankung pro 2 Mio. Einwohner eher den seltenen Lungenerkrankungen zuzurechnen.⁷⁰ Für die Praxis hat sich eine Einteilung der PAP in Abhängigkeit vom Lebensalter bewährt:

Die neonatale, d.h. kongenitale Form (Typ I) der PAP zeichnet sich aus durch eine SP-B Defizienz und das Vorhandensein von SP-C-Proformen aus.⁵⁵ Immunhistochemisch kann bei allen Patienten mit einer PAP eine abnorme intraalveoläre SP-A Akkumulation unabhängig vom Lebensalter bei Erkrankungsbeginn und klinischem Verlauf nachweisen.⁷ Das klinische Bild zeigt bei dieser Form der PAP ein sich innerhalb der ersten Lebensstunden entwickelndes Atemnotsyndrom, welches sich auch durch verschiedenste Therapieansätze (SP-B Substitution, ECMO, Dexamethason, etc.) nicht bessert. Die erkrankten Neugeborenen versterben innerhalb der ersten Lebenswochen oder -monate an einer respiratorischen Insuffizienz.⁷ Als molekulare Grundlage dieses hereditären SP-B Mangels gilt die Mutation des auf Chromosom 2 gelegenen und 11 Introns enthaltenden SP-B Gens. Bislang wurden 35 Mutationen beschrieben, welche zu einer kongenitalen SP-B Defizienz führen.^{56;77} Die mit etwa 50-60% häufigste Mutation 121ins2 substituiert 3

Basen (GAA) für ein einzelnes Nukleotid Cytosin, was zur Zerstörung von Exon 121 führt.²⁵ Da reifes intrazelluläres SP-B pathophysiologisch eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung von pro SP-C zu reifem SP-C spielt, führt fehlendes SP-B zu einer Anhäufung von aberranten SP-C Formen im Alveolarraum. Die einzige therapeutische Option bei Patienten mit hereditärem SP-B Mangel ist die Lungentransplantation.

Zu der Gruppe der kindlichen Form der PAP (Typ II) liegen kaum molekulare Befunde vor. Sie umfasst Kinder mit mäßig ausgeprägter SP-B-Defizienz¹⁷ und Anreicherung des inkomplett prozessierten proSP-B im Alveolarraum oder Defekten der gemeinsamen β -Kette des GM-CSF/IL3/IL5-Rezeptors.²⁵ Die Typ-II-Alveolarproteinose weist ferner eine mäßige intraalveoläre SP-D Akkumulation auf.⁷ Als Therapie besteht die Möglichkeit der therapeutischen Lungenlavage.

Die Pathogenese der juvenilen und adulten PAP (Typ III) ist noch ungeklärt. Viele Befunde weisen blockierende Autoantikörper gegen GM-CSF nach.⁴¹ Auch wurde eine intraalveoläre Akkumulation eines inkomplett prozessierten pro SP-B und eine mäßige intraalveoläre SP-D Akkumulation beobachtet.⁷ Als Therapie der Wahl gilt die therapeutische Ganzlungenlavage, die meist sehr gut anspricht.

Tabelle I.C.1: Differenzierung der Pulmonalen Alveolarproteinose nach Brasch et al.⁷

	<u>TYP I</u>	<u>TYP II</u>	<u>TYP III</u>
	Neonatale Form	Kindliche Form	Juvenile/Erwachsene Form
Erkrankungsbeginn	Neugeborenenalter	Neugeborenen und Säuglingsalter	Säuglings-, Kindes- und Erwachsenenalter
Immunhistochemische Befunde	Intraalveoläre SP-A-Akkumulation		
	Kongenitaler SP-B Mangel und intraalveoläre Akkumulation eines partiell prozessierten pro SP-C	Intraalveoläre Akkumulation eines partiell prozessierten proSP-B	
Ursache	121 ins2, 122delT, weitere SFTPB Mutationen	Mutation / GM-CSF Autoantikörper	
Klinischer Verlauf	letal		nicht letal

I.D. Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von pädiatrischen und adulten pulmonalen Alveolarproteinosen. In diesem Zusammenhang soll im Besonderen näher auf die Analyse der Lavagen, den Zusammenhang zwischen

klinischem Verlauf, therapeutischer Interventionen und den Surfactantparametern und der Analyse einer aberranten pro SP-C Form eingegangen werden.

Die gestellten Ziele lassen sich in Form folgender Fragen zusammenfassen:

Analyse der Lavagen:

- a) Wieviel Surfactant wird durch eine Ganzlungenlavage aus der Lunge gewaschen?
- b) Wie groß sind die Unterschiede zwischen rechter und linker Lungenseite und wie groß ist die Variabilität der Auswascheffizienz im Langzeitverlauf?
- c) Wie ist bei der einzelnen Lavage die Kinetik in Abhängigkeit von den gewonnen Fraktionen für den Gehalt an Phospholipiden , SP-A, SP-B, SP-C, SP-D und den pro Formen?
- d) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Trübung (optischen Dichte) und den Surfactantparametern, so dass durch einfache photometrische Messung die Auswascheffizienz simultan während der Untersuchung verfolgt werden kann? Bei welcher Wellenlänge sollte hier ein optimales Monitoring erfolgen?
- e) Wie verändert sich die Lavage durch Einspülung von Perfluorcarbon während der BAL?
- f) Wie ist die biophysikalische Surfactantfunktion der PAP Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten und wie verändert sich diese im Verlauf der Lavage?

Biochemische Charakterisierung einzelner Patienten:

- a) Welche Veränderungen im Muster der Surfactantproteine lassen sich bei einem PAP Patienten mit einer Mutation im SP-C Gen erkennen?
- b) Welches Glycosilierungsmuster zeigen zwei PAP Patienten bei ihren Proformen?

Zusammenhang zwischen klinischem Verlauf, therapeutischer Intervention und den Surfactantparametern:

- a) Gibt es eine Korrelation zwischen klinischem Effekt und biochemisch nachgewiesener Menge an entferntem Surfactant? Welchen Einfluß hat in diesem Zusammenhang die Therapie mit Glucocorticoiden und GM-CSF?
- b) Welchen Einfluß hat die Applikationsform von GM-CSF? (subcutan oder inhalativ?)
- c) Wie verändern sich die pro-Formen von SP-C im Langzeitverlauf bei Patienten mit PAP?

Quantifizierung von SP-B:

- a) Lässt sich für die Quantifizierung von SP-B eine HPLC Methode entwickeln, die auf sämtliche Patienten anwendbar ist?

II. Material und Methoden

II.A. Patienten und gesunde Kontrollgruppen

Das Patientenkollektiv bestand aus 4 Patienten mit nachgewiesener juveniler pulmonaler Alveolarproteinose (J) und 6 Patienten mit adulter Pulmonaler Alveolarproteinose (A). Ein Patient litt an einer Cholesterolpneumonitis (L). Sämtliche pädiatrischen Patienten wurden im Dr. von Haunerschen Kinderspital behandelt und auch lavagiert.

Tabelle II.A.1.: Patientenkollektiv PAP und Cholesterolpneumonitis

Patient	Geschlecht	Körper- gewicht (kg)	Alter bei Diagnose- stellung (Jahre)	Follow up (Jahre)	Anzahl der Halblungen- lavagen		Anzahl der 500 ml Flaschen je Lavage	
					rechts	links	rechts	links
J01	männlich	8,5	1,75	5,8	11	9	6 (4/7)	9 (7/10)
J02	weiblich	14,5	2,75	7,8	7	8	7 (6/10)	8 (6/10)
J03	weiblich	4,5	0,33	0,3	1	1	8	2
J04	männlich	4,3	0,08	0,25	1	1	4	2
A01	weiblich	70	39,5	lebend	1	1	29	28
A02	weiblich	70	39	lebend	0	1	0	13
A03	weiblich	70	49	lebend	1	0	35	0
A04	weiblich	70	37	lebend	1	0	27	0
A05	männlich	80	51,5	lebend	1	1	24	20
A06	männlich	80	43,5	lebend	1	1	39	31
L01	männlich	13	6,5	13,5	1	1	2	-

Das Kontrollkollektiv (C) stellte zehn Kinder dar, bei denen keine pulmonale Erkrankung vorlag. Die Proben wurden im Rahmen einer Operation im Hals-Nasen-Ohren-Bereich durch eine bronchoalveoläre Lavage gewonnen. Diese

durchgeführten Lavagen stellten keine therapeutischen Ganzlungenlavagen dar, so dass sich bei jedem Patienten lediglich eine Pool Fraktion ergab. Das Alter der Kinder betrug im Mittel 3,2 Jahre (0,5 – 10,5 Jahre).

Tabelle II.A.2.: Gesunde Kontrollpatienten

Patient	Geschlecht	Körpergewicht (kg)	Lungenseite	Alter bei Diagnosestellung (Jahre)
C01	weiblich	13	rechts	1,5
C02	männlich	20	rechts	5,0
C03	weiblich	16	rechts	4,0
C04	männlich	11	rechts	3,0
C05	weiblich	11	rechts	2,5
C06	männlich	8,5	links	1,5
C07	weiblich	7	links	0,5
C08	männlich	10	links	1,5
C09	männlich	11	links	2,0
C10	männlich	36	links	10,5

II.B. Probengewinnung durch BAL und zytologische Beurteilung

Die Patienten der Kontrollgruppe wurden unmittelbar nach der Intubation lavagiert, indem über den liegenden Tubus ein Absaugkatheter mit Endloch eingeführt wurde. Dazu wurde der Kopf des Kindes auf die linke Seite gelegt, um den rechten Unterlappen zu lavagieren oder umgekehrt. Es wurde viermal eine auf Körpertemperatur vorgewärmte 0,9% Kochsalzlösung instilliert und sofort wieder abgesaugt. Das Volumen betrug jeweils 1 ml/kg Körpergewicht.

Die Lavage erfolgte bei den adulten Patienten durch ein im Mittellappen fixiertes (wedged) Bronchoskop. Die pädiatrischen PAP Patienten wurden durch einen Pulmonalarterienkatheter, der im rechten bzw. linken Stammbronchus fixiert wurde, lavagiert. Es wurde viermal eine auf Körpertemperatur vorgewärmte 0,9% Kochsalzlösung instilliert und sofort wieder abgesaugt. Das Volumen betrug jeweils

1 ml/kg Körpergewicht, bei den adulten Patienten aber nicht mehr als 50 ml. Das zurückerhaltene Volumen der ersten Spülung wurde separat von den übrigen 3 Spülportionen als erste Fraktion aufbereitet und mikrobiologisch untersucht. Die restlichen drei Volumina wurden zu einer Pool Fraktion zusammengefasst. Die anschließende therapeutische Lavage wurde mit jeweils 50 ml 0,9% Kochsalzlösung durchgeführt, bis die abgesaugte BAL Flüssigkeit nach visueller Prüfung ausreichend klar erschien. Die zurückerhaltenen Volumina wurden in ca. 500ml große Portionen abgeteilt und mit fortlaufenden Nummern beschriftet.

Die erste Fraktion und Pool Fraktion wurden separat über sterilisierte Gaze-Filter gereinigt. Dabei wurden nur gröbere Verunreinigungen beseitigt. Anschließend wurde ein Aliquot für die mikrobiologische und virologische Untersuchung entnommen. Die Gesamtzellzahl wurde mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine 10-minütige Zentrifugation bei 200g diente der Zellgewinnung. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, aliquotiert und zusammen mit den Flaschen der therapeutischen Lavage bei -80°C eingefroren. Die Sedimente wurden zweimal mit Hank'scher Lösung gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment erneut zur Anfertigung von Cytospinpräparaten in Hank'scher Lösung resuspendiert. Dabei wurde die Menge der Lösung so gewählt, dass eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen pro ml in der Suspension erreicht wurde. Für die Cytospinpräparation wurden jeweils 0,5 ml eingesetzt, d.h. auf dem Objektträger befanden sich 100.000 Zellen. Diese Zellen wurden zur Zelldifferenzierung nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Diese Untersuchung erfolgte sowohl für die erste Fraktion, als auch für die Pool Fraktion. Die erste Fraktion enthält den überwiegenden Teil der abgeschilferten Epithelzellen⁶¹ und die Pool Fraktionen einen etwas höheren Anteil an Lymphozyten⁵⁹.

Für die folgenden Untersuchungen der Surfactantparameter war das Volumen der ersten Fraktion zu klein. Sie wurde deshalb nicht berücksichtigt. Da für die zytologische Untersuchung der gesamte Pool zentrifugiert wurde und nur der Überstand für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, können sich für den Pool geringere Werte im Vergleich zu den Portionen der therapeutischen Lavage ergeben. Es wurde bei 6 verschiedenen Pool Fraktionen der Einfluß der Zentrifugation auf die Gesamtproteinmenge untersucht und es zeigte sich, dass sich die Gesamtproteinkonzentration durch Zentrifugation um ca. 30% reduzierte. Da im

Folgenden sämtliche verwendete Pool Fraktion zentrifugiert wurden, wurde auf die Einberechnung dieses Fehlers verzichtet.

II.C. Quantitative Proteinbestimmung

- Material:
- * Bio-Rad Proteinassay Farbstoffreagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH No. 500-0006)
 - * Mikrotiterplatten (Greiner, niedrigaffin, 96 Vertiefungen, transparent)
 - * Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel+Lorei No. 42160223)
 - * Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
 - * Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
 - * PBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	0,178 g
NaH ₂ PO ₄	1,560 g
NaCl	8,760 g
H ₂ O	ad 1000 g mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

Tabelle II.C.1.: Zusammensetzung des PBS Puffers

Methode:

Die Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde nach der Methode von Bradford⁶ bestimmt. Das Bio-Rad Farbstoff-Konzentrat wurde zunächst mit Aqua ad injectabilia 1:5 verdünnt und anschließend durch einen Papierfilter filtriert, um es von Präzipitaten zu befreien.

Für den Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden Konzentrationen von BSA in PBS Puffer hergestellt: 5000 µg/ml, 2500µg/ml, 1250µg/ml, 625 µg/ml, 312,5 µg/ml, 156,3 µg/ml, 78,15 µg/ml. Es erfolgte eine Doppelbestimmung der einzelnen Standardkonzentrationen und eine Dreifachbestimmung der Proben mit

jeweils 5 µl. Zum Anfärben der Proben und Standardlösungen wurden diese mit jeweils 100 µl des Farbstoffreagenzes versetzt. Im Photometer wurde die Absorption bei 600 nm abzüglich des Leerwertes (Leerwert = Bio-Rad Reagenz + BSA) ermittelt und mit Hilfe der Standardreihe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

II.D. Lipidextraktion

- Material:
- * Methanol p.a. (Merck No. 1.06009.1000)
 - * Chloroform p.a. (Merck No. 1.02431.1000)
 - * Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
 - * Zentrifuge (Heraeus, Megafuge 1.0 R)
 - * Vortexer (Bender und Hobein AG, Vortex Genie 2)
 - * Verschraubbare Reagenzgläser (Schott)
 - * Pasteurpipetten (Assistent, No. 567/2)

Methode:

Die Abtrennung der lipophilen von den hydrophilen Bestandteilen der Lavage (Phospholipide, SP-B, SP-C) erfolgte mit Hilfe der Methode von E.C. BLIGH und W.J.DYER⁵ und einer anschließenden Folch Waschung.²⁰ Zu Beginn wurden sämtliche verwendeten Glasgefäße mit Chloroform gespült, um sie von Lipidrückständen zu befreien. Die Probe, Chloroform und Methanol wurden im Verhältnis 0,8:1:2 gemischt und anschließend 10 Minuten lang gevortext. Nach weiterer Zugabe von einem Teil H₂O und einem Teil Chloroform wurde erneut 10 Minuten gevortext und anschließend die Probe 10 Minuten lang bei 2.400 U/min (1.000g) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Flüssigkeitsstand wurde außen am Reagenzröhrchen markiert. Danach wurde die phospholipidhaltige Unterphase in ein neues Reagenzglas abpipettiert und das hierdurch fehlende Volumen durch die Lösung nach Folch ersetzt.

Chloroform	86 ml
Methanol	14 ml
H ₂ O	1 ml

Tabelle II.D.1.: Zusammensetzung der Folch Lösung

Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren bei 2.400 U/min (1.000 g) bei Raumtemperatur wurde die sich nunmehr ergebene Unterphase mit der Ersteren vereinigt und die organischen Lösungsmittel unter Stickstoffbegasung bei 40 °C abgedampft.

II.E. Quantitative Phospholipidbestimmung

- Material:
- * Methanol p.a. (Merck No. 1.06009.1000)
 - * Chloroform p.a. (Merck No. 1.02431.1000)
 - * Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
 - * Schwefelsäure konz. (Merck No. 1.00731.1000)
 - * Triton X-100 (Sigma No. 9002-93-1)
 - * Salzsäure konz. rauchend 37% (Merck No.1.00317.1000)
 - * Salpetersäure rauchend 100% (Merck 1.00455.1000)
 - * Ammoniummolybdat tetrahydrat (Sigma No. 12027-67-7)
 - * Malachitgrün (Gurr Ceristain 3404545)
 - * Kaliumdihydrogenphosphat (Merck No. 4873.1000)
 - * Magnesiumnitrat hexahydrat suprapur (Merck No. 1.05855.0050)
 - * Hamiltonspritze (Shorewood)
 - * Assipettor (Assistent)
 - * Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
 - * Mikrotiterplatten (Greiner, niedrigaffin, 96 Vertiefungen, transparent)
 - * Vortexer (Bender und Hobein AG, Vortex Genie 2)
 - * Reagenzgläser (Assistent No. 2775/14)

Methode:

Für die Bestimmung des Phospholipidgehaltes wurde die Methode nach CORAL G. DUCK-CHONG¹⁶ durchgeführt. Hierzu wurden zuvor alle Reaktionsgefäße sowie die Kolben zum Ansetzen der Reagenzien mit konzentrierter Schwefelsäure, die 5% konzentrierte Salpetersäure enthielt, über Nacht gebeizt, um eventuell vorhandenes Phosphat zu entfernen. Dann wurden diese dreimal mit Aqua bidest nachgespült und gründlich getrocknet.

Anorganisches Phosphat in Form von Kaliumdihydrogenphosphat, gelöst in 1M Salzsäure, diente als Standard und wurde als Dreifachansatz in einer Konzentration von 0,1µg, 0,2µg, 0,3µg, 0,4µg und 0,5µg berechnet als Phosphat in Reagenzgläser pipettiert. Als Nullwert diente reine 1M Salzsäure.

Die bei der Lipidextraktion erhaltenen Proben wurden in 2 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (2:1) resuspendiert und jeweils zwei Aliquots a 75 µl pipettiert.

Nun wurden die lipidextrahierten Proben und die Standards mit je 30 µl Magnesiumnitratlösung (10% w/v in Methanol) versetzt und bei 90°C im Heizblock eingedampft. Die Konversion von organischem Phosphat der Phospholipide in anorganisches Phosphat erfolgte daraufhin während des Veraschens der Proben in der offenen Flamme des Bunsenbrenners für ca. 30 Sekunden, wobei nitrose Gase entwichen. Nach der vollständigen Abkühlung wurde das entstandene Phosphat in 1 ml 1M Salzsäure gelöst und 15 Minuten lang bei 95°C erhitzt. Im Wasserbad erfolgte eine erneute Abkühlung auf Raumtemperatur. Danach wurden die Proben gevortext und 500µl davon in neue gebeizte Reagenzgläser überführt.

Folgende Reagenzien wurden hergestellt:

Lösung A	4,2 %ige Ammonium–Molybdat–Lösung in 4,5 M HCl
Lösung B	0,3 %ige Malachitgrün-Lösung in Aqua ad injectabilia
Lösung C	Mischung der Lösungen a und B im Verhältnis 1:3 , gefiltert
Lösung D	1 %iges Triton-X in Aqua ad injectabilia

Tabelle II.E.1.: Reagenzien für Phosphatassay

Jeder Probe und jedem Standard wurde 15 µl der Lösung D zugegeben, um die Stabilität des Farbstoffkomplexes zu erhöhen und die Sensitivität der Messung zu steigern. Nach Zugabe von 1 ml Lösung C und anschließendem Vortexen wurden 280 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und innerhalb von 15 Minuten die Absorption bei 650 nm im Photometer gemessen.

Abschließend wurde der mittlere Phosphatgehalt der Standardproben in einer Regressionsgeraden gegen die Extinktion aufgetragen und hierüber die Phosphatkonzentration der Proben mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism errechnet.

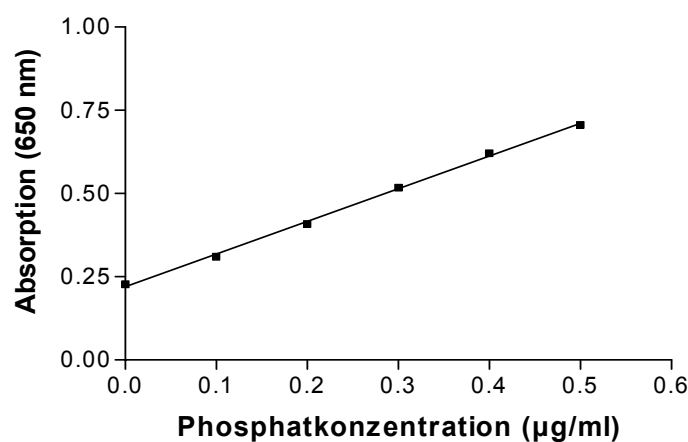


Abbildung II.E.2.: Beispiel einer Standardregressionsgerade

Anhand des im Phosphatassay bestimmten Phosphatgehaltes der Proben lässt sich deren Phospholipidgehalt berechnen. Der Phosphatgehalt der Phospholipide beträgt 4% und die Molare Masse der Phospholipide im Mittel 760 g/Mol.

II.F. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

- Material:
- * Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
 - * Ethylendiamintetraessigsäure – Natrium (Merck 324503)
 - * Triton X-100 (Sigma No. 9002-93-1)
 - * Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel+Lorei No. 42160223)
 - * 2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)] = ABTS (Boehringer Nr. 1112427)
 - * 2,2-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazolin-sulphonate-(6)] Puffer = ABTS-Puffer (Boehringer No. 1112597)

- * Wasserstoffperoxid 30% (Merck No. 107298)
- * IPS Heizblock für Mikrotiterplatten (Sanofi)
- * Anthos Ht III Mikrotiterplattenleser (Anthos Labtec Instruments, Typ 12600)
- * Mikrotiterplatten (Nunc, Maxisorp C96)
- * Ultraschallbad (Sonorex RX 100)
- * Carbonatpuffer:

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	35 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 9,6 einstellen

- SP-A:
- * Festphasenantikörper PC-6, monoklonaler Maus Antikörper gegen humanes SP-A (Kaoru Taniguchi Japan)
 - * „Sandwich“ Antikörper SP-A, polyklonaler Kaninchen Antikörper gegen humanes rekombinantes SP-A (ByK Gulden)
 - * Anti Kaninchen IgG von Ziege gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (Dianova)
 - * Standard Antigen A: humanes rekombinantes SP-A (ByK Gulden)
 - * TBS Puffer für SP-A:

Tris-HCl	10 mM
NaCl	140 mM
Triton-X 100	0,1 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

- SP-D:
- * Festphasenantikörper P13 (Dr. E. Crouch)
 - * „Sandwich“ Antikörper SP-D, VI F 11, monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten SP-D (BMA)
 - * Anti Maus IgG vom Hasen gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (Dianova)
 - * Standard Antigen D: humanes rekombinantes SP-D (Dr. E. Crouch)

* TBS Puffer für SP-D:

Tris-HCl	10 mM
NaCl	140 mM
Triton-X 100	0,1 %
CaCl	5 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

II.F.1. Quantitative SP-A Bestimmung

Coating: Der Festphasenantikörper PC – 6 wurde in Carbonatpuffer gelöst und in einer Konzentration von 2µg/ml und einem Volumen von 100µl in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Blocking: Die Lösung und mit ihr der nicht gebundene Antikörper wurde dekantiert und verworfen. Um die Bindung der nachfolgend hinzugefügten Proteine an die Festphase zu verhindern, wurde die Platte eine Stunde bei 37°C mit 10mg/ml BSA, gelöst in TBS Puffer, inkubiert. Es wurden jeweils 200 µl in jedes Well pipettiert.

Inkubation mit Antigen: Als Standard Antigen wurde SP-A in Verdünnungen von 100 ng/ml bis 1,5 ng/ml in Blockpuffer gelöst aufgetragen. Es wurden 2 Standardreihen erstellt, wobei durch zweifache Verdünnung über 7 Wells der Messbereich des Assays festgelegt wurde. Wells wurden für den Leerwert nur mit Blockpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit einem 10 mM EDTA enthaltenen TBS Puffer fünffach verdünnt, im Ultraschallbad 1 Minute homogenisiert und mit Triton X 22% ,gelöst in H₂O, auf eine 5,5 fache Verdünnung eingestellt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden auf der Platte sequenziell 1:1 mit Blockpuffer verdünnt. Die Platten wurden bei 37°C eine Stunde auf dem IPS Inkubator inkubiert.

Inkubation mit 2. Antikörper: Nun erfolgte die Entfernung aller ungebundenen Reagenzien, indem jedes Well dreimal mit Pufferlösung gefüllt und anschließend

wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurden 100µl des SP-A „Sandwich“ Antikörpers in einer zehntausendfachen Verdünnung in Blockpuffer (1% BSA in TBS Puffer) aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Detektion des Intermediärkomplexes: Daraufhin wurde wieder mit Pufferlösung 3 mal gewaschen und dann der Intermediärkomplex detektiert, indem das anti-Kaninchen IgG, meerettichperoxidasekonjugiert, 1 : 5000 verdünnt in TBS Puffer, einpipettiert wurde. Wiederum erfolgte eine Inkubation bei 37°C mit dreimaligen Waschen.

Substratreaktion: Als Substratreaktion wurde nun ABTS durch die Peroxidase des 2. Antikörpers in ein chromophores Produkt umgesetzt. Dazu wurde ABTS in einer Konzentration von 1 mg/ml im ABTS Puffer angesetzt, mit 30% H₂O₂ versetzt (Endkonzentration 0,001% H₂O₂) und jeweils 100 µl davon aufgetragen. Die Platte wurde anschließend mit Aluminiumfolie bedeckt und 30 – 60 Minuten auf einem Schüttler inkubiert.

Detektion: Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Als optimaler Messbereich wurde derjenige Abschnitt auf der Standardkurve festgelegt, welcher ein mindestens doppeltes Signal des Leerwertes aufwies und in dem eine ausreichende Steigung vorlag.

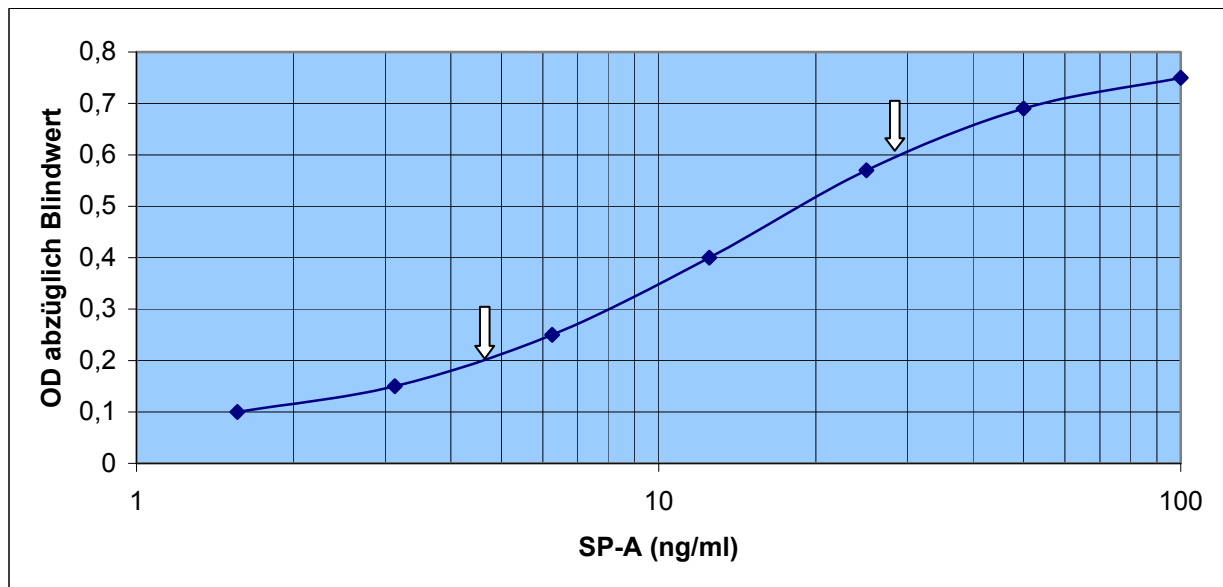


Abbildung II.F.1.1.: Beispiel einer Standardkurve. Der Bereich zwischen den Pfeilen markiert den optimalen Messbereich von 0,2 bis 0,6 OD. Der Leerwert war OD 0,01.

II.F.2. Quantitative SP-D Bestimmung

Coating: Der Festphasenantikörper P 13 wurde in Carbonatpuffer gelöst und in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$ und einem Volumen von $100\mu\text{l}$ in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde mit Parafilm bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Blocking: Die Lösung und mit ihr der nicht gebundene Antikörper wurde dekantiert und verworfen. Um die Bindung unspezifischer Proteine an die Festphase zu verhindern, wurde die Platte eine Stunde bei 37°C mit 10mg/ml BSA, gelöst in TBS Puffer, inkubiert. Es wurden jeweils $200\mu\text{l}$ in jedes Well pipettiert.

Inkubation mit Antigen: Als Standard Antigen wurde SP-D in Verdünnungen von 100 ng/ml bis $1,5\text{ ng/ml}$ in Blockpuffer gelöst aufgetragen. Es wurden 2 Standardreihen erstellt, wobei durch zweifache Verdünnung über 7 Wells der Messbereich des Assays festgelegt wurde. Wells wurden für den Leerwert nur mit Blockpuffer gefüllt. Die nativen Proben wurden zweifach in Blockpuffer verdünnt und auf der Platte

wiederum sequenziell 1:1 mit Blockpuffer verdünnt und davon 100 µl in jedes Well aufgetragen. Die Platten wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert

Inkubation mit 2. Antikörper: Nun erfolgte die Entfernung aller ungebundenen Reagenzien, indem jedes Well dreimal mit Pufferlösung gefüllt, und anschließend wieder abgesaugt wurde. Anschließend wurde der SP-D „Sandwich“ Antikörper in einer Verdünnung von 1µg/ml in Blockpuffer (1% BSA in TBS Puffer) aufgetragen und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Detektion des Intermediärkomplexes: Daraufhin wurde wieder mit Pufferlösung 3 mal gewaschen und anschließend der Intermediärkomplex detektiert, indem das anti-Maus IgG, Meerrettichperoxidase gekoppelt, 1:100 verdünnt in TBS Puffer, einpipettiert wurde. Wiederum erfolgte eine Inkubation bei 37°C mit anschließendem dreimaligen Waschen.

Substratreaktion: Als Substratreaktion wurde nun ABTS durch die Peroxidase des 2. Antikörpers in ein chromophores Produkt umgesetzt. Dazu wurde ABTS in einer Konzentration von 1 mg/ml im ABTS Puffer angesetzt, mit 30% H₂O₂ versetzt (Endkonzentration 0,001% H₂O₂) und jeweils 100 µl davon aufgetragen. Die Platte wurde anschließend mit Aluminiumfolie bedeckt und 30 – 60 Minuten auf einem Schüttler inkubiert.

Detektion: Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die Berechnung der Standardkurve aus den zwei Standardreihen und dem Leerwert sowie die davon abhängige Berechnung der Messwerte erfolgte mit der speziellen Biolise Software. Als optimaler Messbereich wurde derjenige Abschnitt auf der Standardkurve festgelegt, welcher ein mindestens doppeltes Signal des Leerwertes aufwies und in dem eine ausreichende Steigung vorlag.

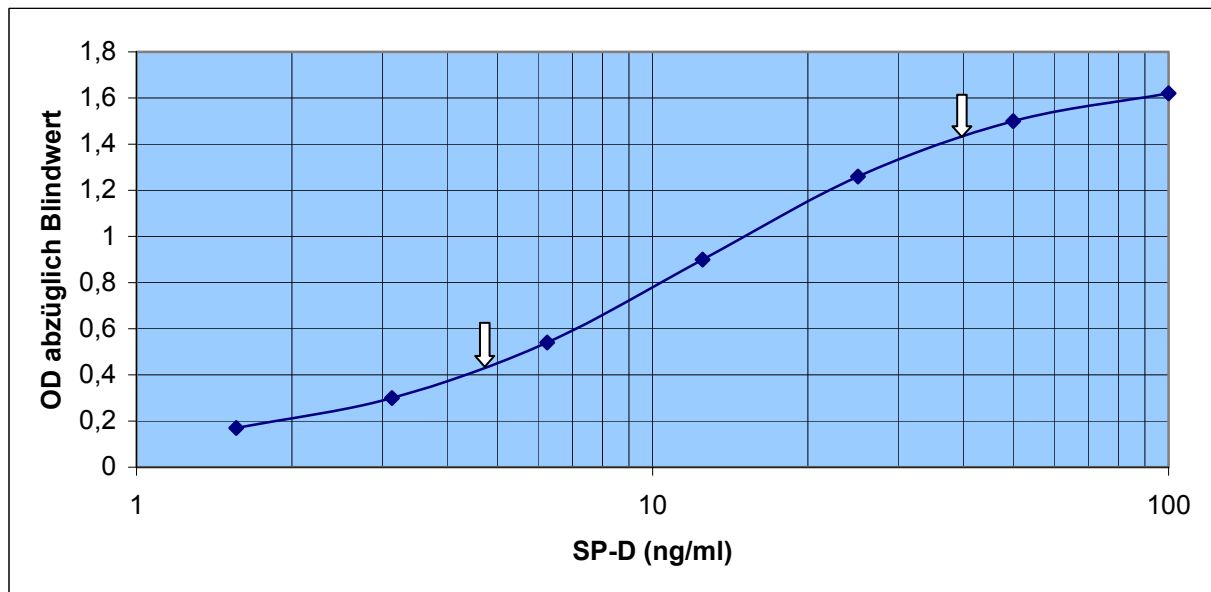


Abbildung II.F.2.1.: Beispiel einer Standardkurve. Der Bereich zwischen den Pfeilen markiert den optimalen Messbereich von 0,4 bis 1,4 OD. Der Leerwert war OD 0,01.

II.G. 1D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

Material:

- Elektrophorese:
- * Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton (Millipore)
 - * NuPAGE MES Running Buffer (Invitrogen, NP0002)
 - * NuPAGE MOPS Running Buffer (Invitrogen, NP0001)
 - * NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007)
 - * Aqua ad injectabilia (Braun Melsungen AG, No. 3703452)
 - * NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen, NP0004)
 - * Probenpuffer:

LDS Sample Buffer	25%
Reducing Agent	10%
H ₂ O	65%

- * NuPAGE Novex 10% Bis-Tris Gel (Invitrogen, NP0315)

- * NuPAGE Antioxidant (Invitrogen, NP0005)
- * MultiMark Multi-Colored Standard (Invitrogen, LC5725)
- * Xcell SureLock Minicell Kammer (Invitrogen, EI 0001)
- * PowerEase 500 Power Supply (Invitrogen, EI8700)
- * Wasserbad (Paratherm S100 Julabo)

Westernblot:

- * Xcell II Blot Module (Invitrogen, EI9051)
- * NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, NP0006)
- * Nitrocellulosemembran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)
- * Transferpuffer:

NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H ₂ O	75%

Silberfärbung:

- * Fixierungslösung:

Ethanol	30%
Essigsäure konzentriert	10%
H ₂ O	60%

- * Inkubationslösung:

Natriumacetat	68 g
Ethanol	300 ml
Natriumthiosulfat	2 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

- * Silberlösung:

Silbernitrat	2 g
Formaldehyd 37%	200 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

* Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	25 g
Formaldehyd 37%	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

Immunodetektion: * Fischgelatine (Sigma G-7765)

* TBS-Puffer:

Tris-HCl	4 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

* PBS-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	12 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	3 mM
NaCl	150 mM
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

* Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel No. 42160223)

* ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)

* Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)

* Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)

* Entwicklungsmaschine (AGFA CP 1000)

Methode:

Probenvorbereitung: Die nativen BAL Proben wurden mit Hilfe von Zentrifugenröhrchen entsalzt, indem die Probe bei 14000 g zentrifugiert und anschließend einmal mit 500 µl Aqua ad injectabilia nachgespült wurde. Um das Konzentrat vollständig aus dem Vorlagegefäß zu gewinnen, wurde das mit dem Konzentratgefäß verschlossene Vorlagegefäß umgedreht und 2 Minuten lang bei 1.600 Umdrehungen pro Minute rückzentrifugiert.

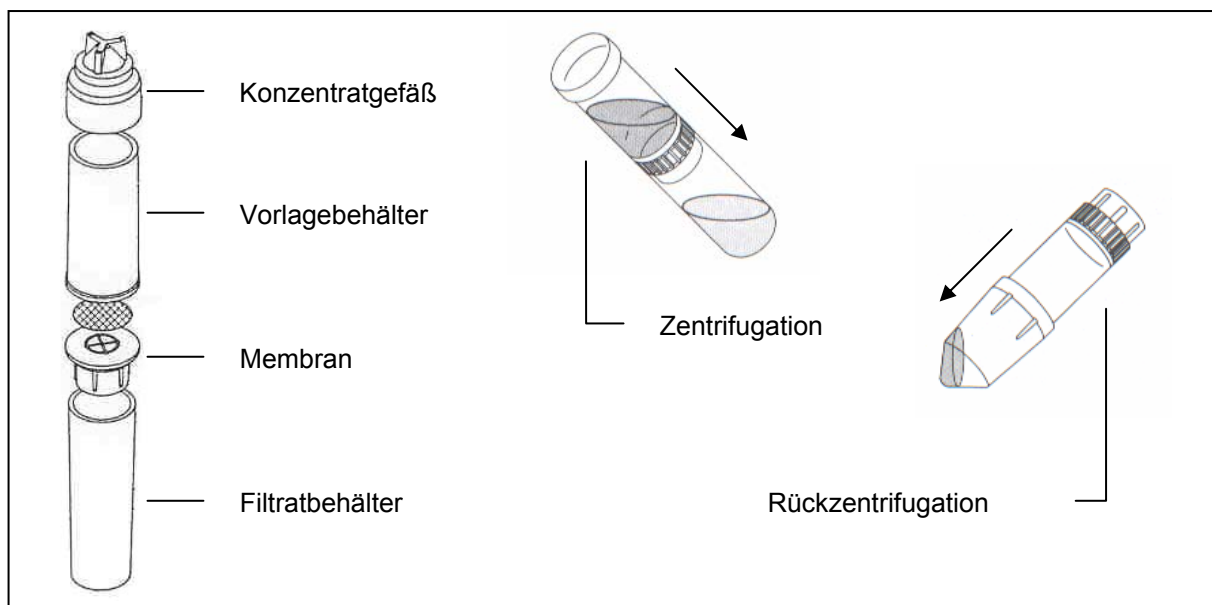


Abb. II.G.1.: Mikrokonzentrator

Anschließend wurde von den Proben der Gesamtproteingehalt gemessen (siehe oben) und die gewünschte Auftragsmenge aliquotiert. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und dann in jeweils 22 µl Probenpuffer aufgenommen. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren bei 1000g für 20 Sekunden wurden die Proben 10 Minuten lang im 70°C Wasserbad inkubiert. Nach erneutem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Gelelektrophorese: Für SP-A und SP-D wurde MOPS Laufpuffer und für SP-B und SP-C wurde MES Laufpuffer verwendet. Als wide-range Indikator diente MultiMark-12. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten unter folgenden Laufbedingungen: 200 V, 100 mA, 35 min. Nach dem

Elektrophoreselauf erfolgte entweder eine Silberfärbung der Gele oder ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine Nitrocellulosemembran.

Silberfärbung: Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven / Dernick (1985) angewendet. Das Gel wurde 30 Minuten in der Fixierungslösung fixiert und anschließend weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem 15 minütigem Waschen wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silberlösung versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde zwischen 3 und 10 Minuten gewartet, je nach Farbintensität der Banden, und dann die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt.

Westernblott: Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine Nitrocellulosemembran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA im NuPAGE Transfer Buffer.

Immunodetektion: Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 5% Fischgelatine. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch viermaliges Waschen mit TBS Puffer jeweils 15 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase konjugiert) in TBS Puffer für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBS gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit den Softwareprogrammen Melanie3 und Quantity One ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind im Ergebnisteil jeweils genau beschrieben.

II.H. 2D Gelelektrophorese und Westernblotanalyse

Material:

- Elektrophorese:
- * Microcon Zentrifugenfilter, Ausschlussgrenze 3000 Dalton (Millipore)
 - * ZOOM Strip pH 3-10 (Invitrogen ZM0011)
 - * ZOOM IPGRunner Cassette (Invitrogen ZM0003)

- * NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris ZOOM Gel (Invitrogen NP0330)
- * Probenpuffer:

Harnstoff	42,04g
Thioharnstoff	15,24g
H ₂ O	ad 53 ml
Mit Serdolit Ionenaustauscher 15 min rühren dann filtrieren	2g
CHAPS	2g
DTT	1g
ZOOM Carrier Ampholytes 3-10	2ml
Pefabloc	43mg
H ₂ O	ad 100ml

- * Equilibrierungspuffer 1:

LDS Sample Buffer	1,25ml
Reducing Agent	500µl
H ₂ O	3,25ml

- * Equilibrierungspuffer 2:

LDS Sample Buffer	1,25ml
Iodoacetamid	116mg
H ₂ O	3,75ml

- * Agarose (Invitrogen 15510019)

Westernblot:

- * Xcell II Blot Module (Invitrogen, EI9051)
- * NuPAGE Transfer Buffer (Invitrogen, NP0006)
- * Transferpuffer:

NuPAGE Transfer Buffer	5%
Methanol	20%
H ₂ O	75%

- * Nitrocellulosemembran (Millipore, Immobilon IPVH 00010)

Silberfärbung:

- * Fixierungslösung:

Ethanol	30%
Essigsäure konzentriert	10%
H ₂ O	60%

- * Inkubationslösung:

Natriumacetat	68 g
Ethanol	300 ml
Natriumthiosulfat	2 g
H ₂ O	Ad 1000 ml

- * Silberlösung:

Silbernitrat	2 g
Formaldehyd 37%	200 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

- * Entwicklerlösung:

Natriumcarbonat	25 g
Formaldehyd 37%	100 µl
H ₂ O	Ad 1000 ml

Immunodetektion:

- * Fischgelatine (Sigma G-7765)

- * TBS-Puffer:

Tris-HCl	4 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0,05 %
in H ₂ O lösen	auf pH 7,4 einstellen

* PBS-Puffer:

Na_2HPO_4	12 mM
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3 mM
NaCl	150 mM
in H_2O lösen	auf pH 7,4 einstellen

* Bovines Serum Albumin V, BSAV (Paesel No. 42160223)

* ECL Chemilumineszenzlösung (Amersham RPN2106)

* Entwicklungskassette (Amersham RPN11646)

* Röntgenfilme (Amersham RPN 2103)

* Entwicklungsmaschine (AGFA CP1000)

Methode:

Probenvorbereitung: Die nativen BAL Proben wurden mit Hilfe von Zentrifugenröhrchen entsalzt, indem die Probe bei 14000 g zentrifugiert und anschließend einmal mit 500 μl Aqua ad injectabilia nachgespült wurde. Um das Konzentrat vollständig aus dem Vorlagegefäß zu gewinnen, wurde das mit dem Konzentratgefäß verschlossene Vorlagegefäß umgedreht und 2 Minuten lang bei 1.600 Umdrehungen pro Minute rückzentrifugiert.

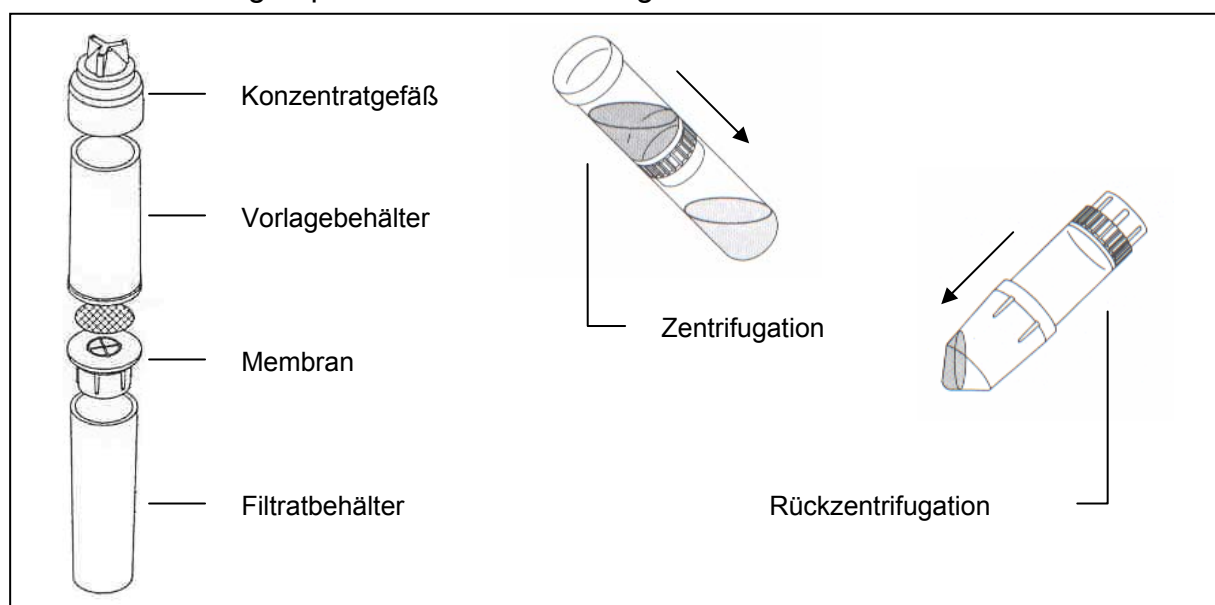


Abb. II.H.1.: Mikrokonzentrator

Anschließend wurde von den Proben der Gesamtproteingehalt gemessen (siehe oben) und die gewünschte Auftragsmenge von 80 µg aliquotiert. Die Proben wurden in der Vakuumzenrifuge lyophilisiert und dann in jeweils 155 µl Probenpuffer resuspendiert. Jeweils eine Probe wurde vollständig in einen Quellkanal einpipettiert und jeweils ein isoelektrischer Fokussierungstreifen nachgeschoben. Die Kassette wurde versiegelt und 8 -16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Fokussierung: Nach Entfernen der Versiegelung erfolgte die isoelektrische Fokussierung in der ZOOM Mini-Cell unter folgenden Bedingungen: 500V, 1mA/Streifen, 3 Stunden.

Equilibrierung: Nach erfolgreicher Fokussierung wurden die Streifen aus der Kassette genommen und 15 Minuten lang in der Equilibrierungslösung 1 horizontal geschüttelt. Nach weiteren 15 Minuten in Equilibrierungslösung 2 wurde jeweils ein Streifen in eine ZOOM Gelkassette horizontal eingelegt und mit heißer 0,5%iger Agaroselösung überschichtet.

Gelelektrophorese: Nach Trocknen der Agarose wurde eine vertikale Gelelektrophorese mit MES Puffer durchgeführt. Als wide-range Indikator diente MultiMark 12. Für stabile reduzierende Bedingungen sorgte die Zugabe von NuPAGE Antioxidant zum Laufpuffer. Die Elektrophorese erfolgte in den Mini Cell Kassetten unter folgenden Laufbedingungen: 200 V, 100 mA, 42 min. Nach dem Elektrophoreselauf erfolgte entweder eine Silberfärbung der Gele oder ein Proteintransfer (Westernblot) auf eine Nitrocellulosemembran.

Silberfärbung: Für die Silberfärbung wurde die Methode nach Heukeshoven / Dernick (1985) angewendet. Das Gel wurde 30 Minuten in der Fixierungslösung fixiert und anschließend weitere 30 Minuten in der Inkubationslösung inkubiert. Nach dreimaligem 15 minütigem Waschen wurde das Gel 20 Minuten lang in der Silberlösung versilbert. Nach Zugabe der Entwicklerlösung wurde zwischen 3 und 10 Minuten gewartet, je nach Farbintensität der Banden, und dann die Färbereaktion durch Zugabe von 5%iger Essigsäure gestoppt.

Westernblott: Der Proteintransfer erfolgte im vertikalen „SemiDry“ Verfahren unter Nutzung des Xcell II Blot Modules auf eine Nitrocellulosemembran für 60 Minuten bei 30V und 170 mA im NuPAGE Transfer Buffer.

Immunodetektion: Die Membran wurde 3 Stunden in PBS Puffer mit 3% Fischgelatine inkubiert, um eine Absättigung der freien Bindungsstellen zu erreichen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper in PBS Puffer mit 5% Fischgelatine. Nach Entfernen von überschüssigen, nicht gebundenen Antikörpern durch viermaliges Waschen mit TBS Puffer jeweils 15 Minuten wurde mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase konjugiert) in TBS Puffer für 2 Stunden inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit TBS gewaschen und schließlich nach Aktivierung mit der ECL Chemilumineszenzlösung auf Röntgenfilmen entwickelt. Die fertigen Filme wurden anschließend mit dem FluorS Multi Imager eingescannt und mit den Softwareprogrammen Melanie3 und Quantity One ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind im Ergebnissteil jeweils genau beschrieben.

II.I. Kapillarsurfactometer

- Material:
- * Kapillarsurfactometer (Calmia Medical, Inc.)
 - * Glas Kapillaren (Calmia Medical, Inc. No. CSGC – 500)
 - * Pipette 0,5 µl (Calmia Medical, Inc.)
 - * Pipettenspitzen (Calmia Medical, Inc.)
 - * Puffer:

NaCl	140 mM
HEPES	10 mM
EDTA	0,5 mM
Kalziumchlorid	3,5 mM
In H ₂ O lösen mit NaOH auf pH 6,9 einstellen	

Probenvorbereitung: Vor der Messung wurde ein 40.000 g Pellet erstellt. Es dient dazu, die großen Aggregate (LA`s: large aggregates) von den kleinen (SA`s: small

aggregates) zu trennen. Dazu wurden 5 ml jeder nativen BAL Probe mit 40.000 g (entspricht 18.185 Umdrehungen pro Minute) bei 4 °C 30 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet, welches die LA's enthält, wurde in 1 ml Aqua bidest. resuspendiert und darin der Phospholipidgehalt bestimmt (s. II.D.). Die Messung der Oberflächenspannung im Kapillarsurfactometer erfolgten bei einer Phospholipidkonzentration von 1 mg/ml. Dazu wurde das gelöste 40.000 g Pellet in der Vakuumzentrifuge lyophilisiert und anschließend in einer entsprechender Menge des Puffers resuspendiert.

Die verwendeten Kapillaren wiesen eine Engstelle mit dem Innendurchmesser von 0,255 mm auf. Von der Testflüssigkeit wurden 0,5 µl in die Engstelle der Kapillare pipettiert. Durch die Flüssigkeit wurde die Engstelle funktionell verschlossen. Die Kapillare wurde am Kapillarenhalter des Geräts aufgesteckt und in das 37 °C warmes Wasserbad abgesenkt. Das Gerät erzeugte einen Luftstrom durch die Kapillare entgegen der Testflüssigkeit. Aufgrund des Verschlusses durch die Flüssigkeit wurde ein positiver Druck aufgebaut. Die Flüssigkeit wurde dadurch in den weiten Teil der Kapillare vorgeschoben und dort an die Wand der Kapillare gedrückt, so dass die Luft ungehindert vorbeiströmen konnte. Der Druck fiel dann ab. Das Kapillarsurfactometer registrierte den Druck der zum erstmaligen Öffnen der Kapillare nötig war. Dieser Wert wurde als initialer Druck bezeichnet und in der Einheit cm H₂O angegeben. Das Verhältnis der gesamten Zeit, während der die Kapillare offen war zur gesamten Messdauer multipliziert mit 100, wurde vom Gerät berechnet. Im englischen Schrifttum wird die Einheit %Open verwendet und wird deshalb in dieser Arbeit als %Offen bezeichnet.¹⁸

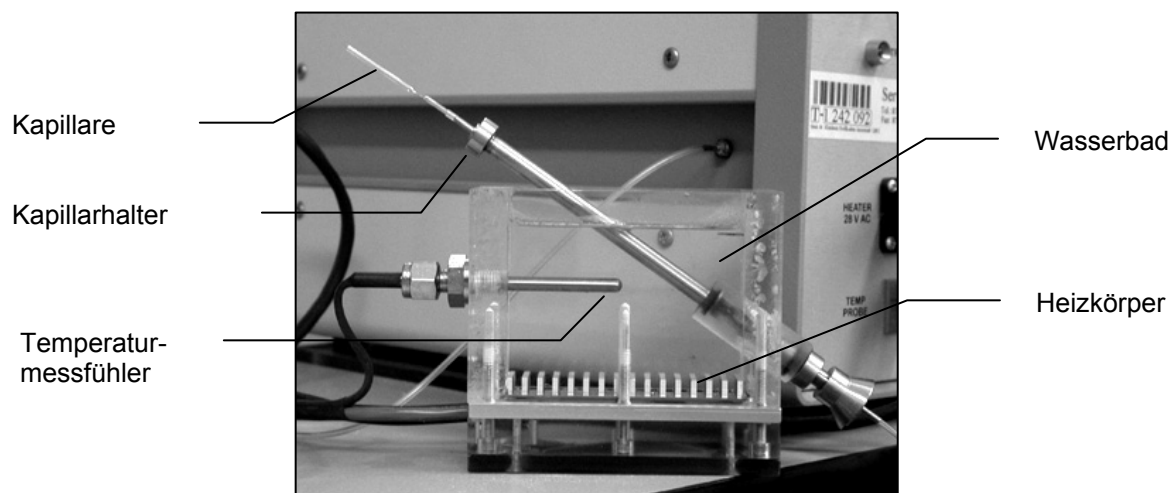


Abbildung II.1.1.: Probenbad des Kapillarsurfactometers

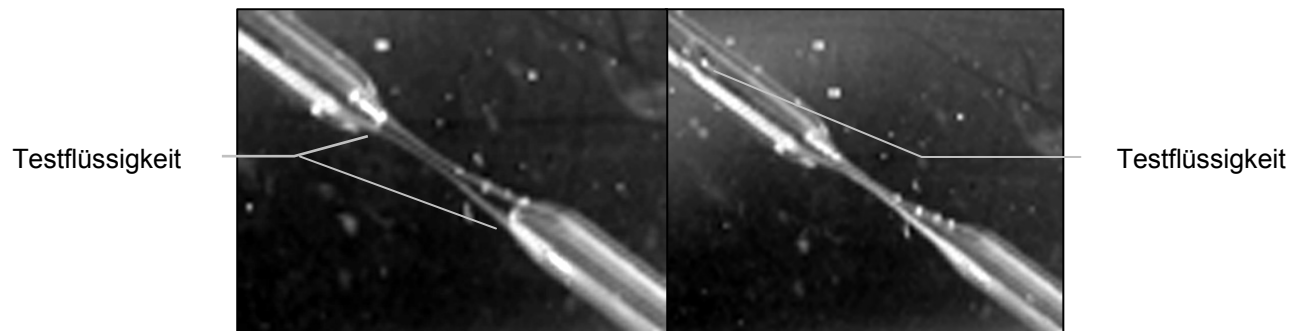


Abbildung II.1.2.: Kapillare während einer Messung. Links: Testflüssigkeit in der Engstelle, rechts: Flüssigkeit wurde durch den Luftstrom (durch Pfeile dargestellt) in den breiteren Abschnitt verdrängt.

Bestand die Flüssigkeit aus reinem Surfactant, dann blieb die Kapillare im Idealfall über die gesamte Messzeit von 120 Sekunden offen. Die Kapillare war 100 % Offen. Bestand die Testflüssigkeit aus einer Salzlösung, dann blieb die Kapillare nicht offen. Die Flüssigkeit strömte sofort in die Engstelle zurück und verschloss sie. Dies wiederholte sich mehrfach bis zum Ende der Messung. Daraus resultierte ein Wert von 0 % Offen. Destilliertes Wasser konnte sowohl den Wert 0 % Offen als auch 100 % Offen annehmen.

Vor jedem Messtag wurde das Kapillarsurfactometer mit Hilfe des Kalibrierungsbades auf einen Druck von 5 cm H₂O geeicht. Anschließend wurden zur Qualitätssicherung je drei Messungen mit Wasser und einem Standard Surfactant durchgeführt (Abbildung II.1.3. und II.1.4).

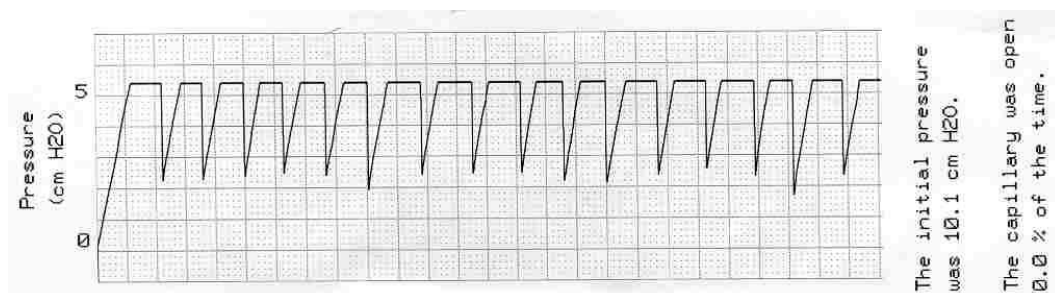


Abbildung II.1.3.: Messung der Offenzeit einer Kapillare bei Wasser. Die Kapillare war hier 0,0 % der Messzeit offen. Der initiale Druck hatte einen Wert von 10,1 cmH₂O.

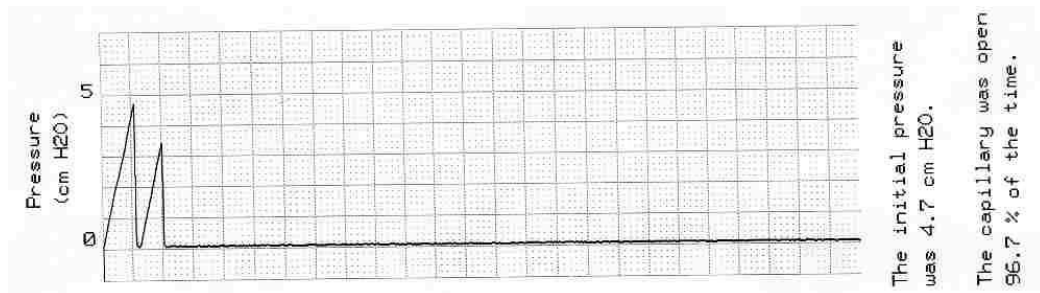


Abbildung II.I.4.: Messung der Offenzeit einer Kapillare bei Surfactant. Die Kapillare war hier 96,7 % der Messzeit offen. Der initiale Druck betrug 4,7 cmH₂O.

Die Proben wurden vor jeder Messung 30 Sekunden lang gevortext und anschließend 0,5 µl davon in die Engstelle der Kapillare eingebracht. Es wurden aufgrund der oftmals relativ hohen Standardabweichung bei jeder Probe mindestens drei Messungen durchgeführt und daraus das arithmetische Mittel gebildet.

II.J. HPLC

- Material:
- * LaChrom HPLC system (Merck)
 - * Rheodyne manual injector, 7725 I (Merck)
 - * Pump, L-7100 (Merck)
 - * Vacuum Entgaser, L-7614 (Merck)
 - * UV-Detektor, L-7400 (Merck)
 - * C4 Butylsilikat Säule, 250x10 mm (Grace Vydac, Hesperia, USA)
 - * Säulenthmostat Jetstream plus (Thermotechnik Products GmbH, Langenzersdorf, Österreich)
 - * Evaporative light scattering detector Sedex[®], Model 75 (Sedere, Frankreich)
 - * HSM D-7000 Software Chromatography Data Station (Hitachi Instruments, San Josè, USA)
 - * Chloroform, LiChrosolv[®] gradient grade (Merck No. 1.02444.1000)
 - * Methanol, LiChrosolv[®] gradient grade (Merck No. 1.06018.1000)
 - * Salzsäure, rauchend, 100% (Merck No. 1.00455.1000)
 - * Trifluoressigsäure, HPLC grade, Ampullen (Fluka No. 91707)

* Extraktionslösung:

Methanol	60%
Chloroform	40%
Salzsäure, rauchend, 100%	0,005 N

* Mobile Phase:

Methanol	97,00 %
Chloroform	2,75 %
0,1M Trifluoressigsäure	0,25 %

Methode:

Probenvorbereitung: Die wässrige bronchoalveoläre Lavage wurde mit der Extraktionslösung im Verhältnis 2:1 versetzt und für 10 Minuten gevortext. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 1.000g ergaben sich 2 Phasen. Die Unterphase mit den enthaltenen Phospholipiden, SP-B und SP-C wurde abpipettiert und die Oberphase ein weiteres Mal extrahiert. Die beiden vereinigten Unterphasen wurden unter Stickstoffbegasung eingedampft und für die HPLC Analyse in einem geeigneten Volumen der mobilen Phase gelöst.

Einstellungen: Als optimale Bedingungen für die HPLC Trennung wurden folgende Einstellungen ermittelt: Säulentemperatur 5°C, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase 1ml/Minute, Injektionsvolumen 20 µl, Dauer der Auftrennung 7 Minuten, ELSD Temperatur 50°C, Druck des Trägergases Stickstoff 3,5 bar, ELSD gain 12. Es zeigten sich bei sämtlichen Messungen ähnliche Chromatogramme, bei welchen der SP-B Peak eindeutig zugeordnet werden konnte (s. Abb. 2.10.1.).

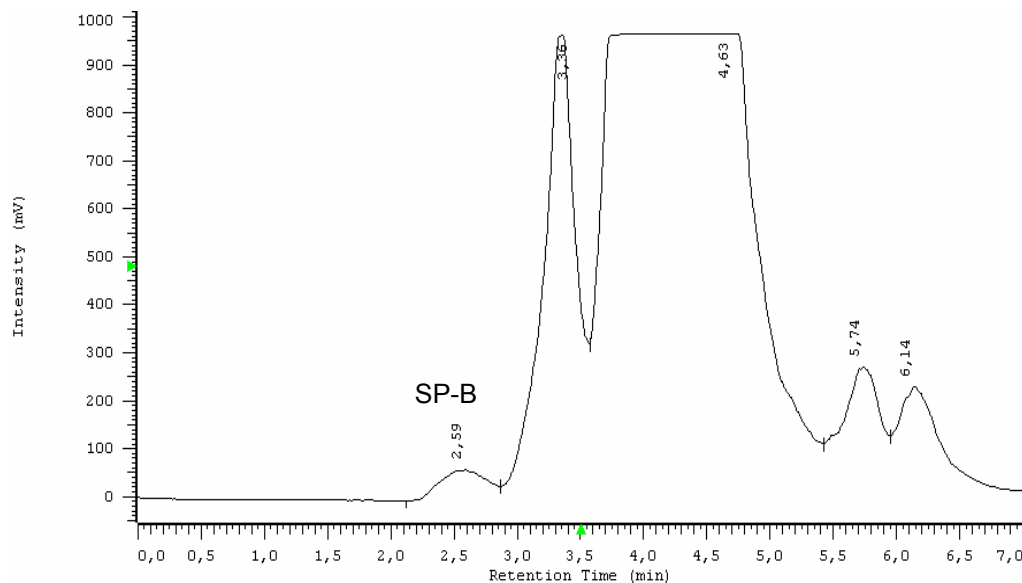


Abbildung II.J.1.: Chromatogramm

Auswertung: Das Chromatogramm wurde aufgezeichnet und die area under the curve (AUC) für den SP-B Peak berechnet. Über eine Eichgerade, erstellt mit gereinigtem humanen SP-B (Geschenk von Schmidt, Giessen), erfolgte die Quantifizierung (s. HPLC Methodenentwicklung).

II.K. Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Graph Pad Prism 4.01 (San Diego, CA, USA) sowie Microsoft Excel 2000 (San Francisco, CA, USA). Für den Vergleich von mehreren Patientengruppen wurde zunächst der Kruskal-Wallis-Test eingesetzt. Falls sich damit ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab, wurde ein Vergleich aller Paare mit Hilfe des Post-Tests nach Dunn angeschlossen. Waren lediglich zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test für ungebundene Stichproben verwendet. Das Konfidenzintervall betrug jeweils 95%. Aus Ergebnissen von Mehrfachmessungen einer Probe wurde jeweils der Mittelwert berechnet und gegebenenfalls der Standardfehler (SEM) angegeben. Innerhalb einer untersuchten Patientengruppe wurden der Median sowie die 25% und 75% Perzentilen berechnet. Für die Korrelationsanalysen wurde der zweiseitige Korrelationskoeffizient nach Pearson bzw. Spearman berechnet. Als relativer Variationskoeffizient wird der

Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert bezeichnet. Er wird in Prozent angegeben. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

III. Ergebnisse

III.A. Therapeutische Halblungenlavagen

III.A.1. Gesamtgehaltsanalyse

III.A.1.1. Protein

III.A.1.1.1. Konzentration

Es wurden die bronchoalveolären Lavagen von 4 juvenilen und 6 adulten PAP Patienten hinsichtlich ihrer Gesamtproteinkonzentration und der Gesamtproteinkonzentration bezogen auf das Körpergewicht untersucht und mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen.

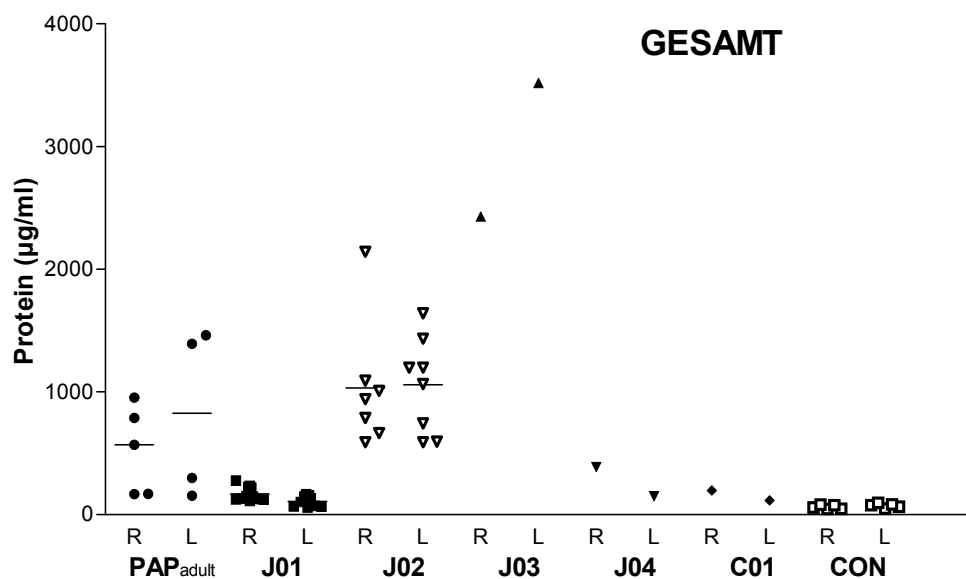


Abb. III.A.1.1.1.1.: Gesamtproteinkonzentration (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

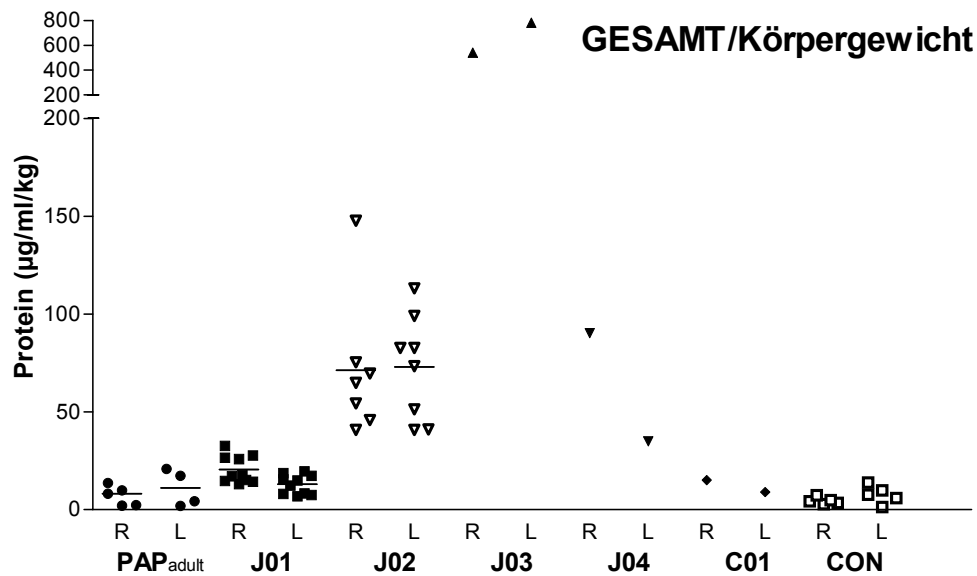


Abb. III.A.1.1.1.2.: Gesamte Proteinkonzentration (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in µg/ml/kg Körpergewicht. PAP_{adult} entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p < 0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p > 0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Juvenile und adulte PAP Patienten zeigten, absolut betrachtet, die gleiche Proteinkonzentration in der Gesamtlavage. Auf das Körpergewicht bezogen, waren die Proteinkonzentrationen der juvenilen Patienten jedoch signifikant erhöht. PAP Patienten hatten gegenüber Kontrollpatienten erhöhte Werte mit Ausnahme der Gruppe der erwachsenen PAP Patienten, wenn das Gesamtprotein auf das Körpergewicht bezogen wurde. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

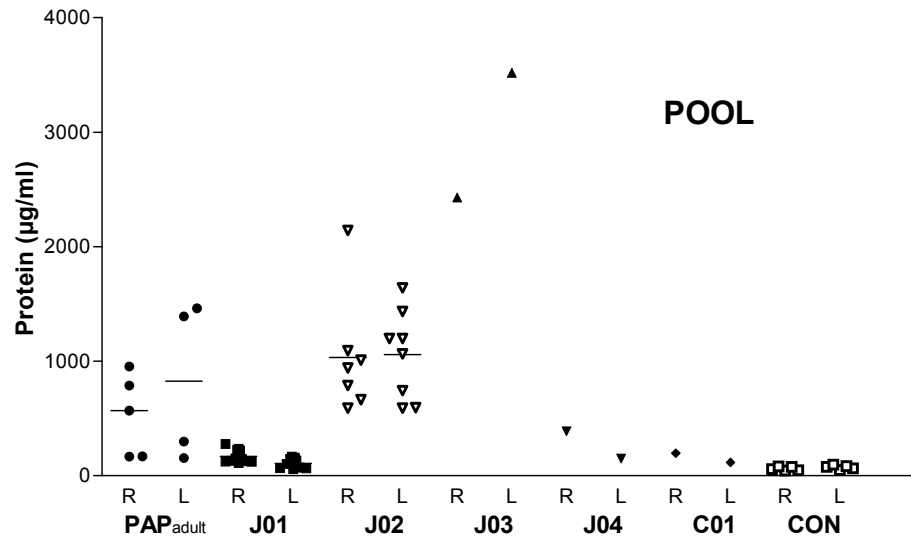


Abb. III.A.1.1.1.3.: Proteinkonzentration der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 9 Pools der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

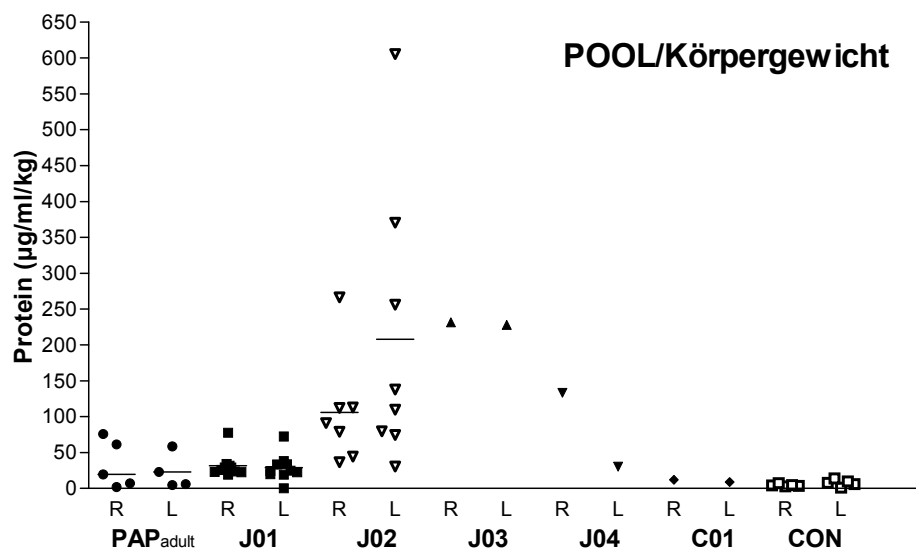


Abb. III.A.1.1.1.4.: Proteinkonzentration der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/ml/kg. PAP adult entspricht 9 Pools der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p > 0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

Die Proteinkonzentration des Pools der adulten PAP Patienten ist absolut und bezogen auf das Körpergewicht gegenüber den juvenilen Patienten nicht signifikant erhöht. PAP Patienten hatten in der Pool Fraktion gegenüber Kontrollpatienten

erhöhte Werte mit Ausnahme der Gruppe der erwachsenen PAP Patienten, wenn das Gesamtprotein auf das Körpergewicht bezogen wurde. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

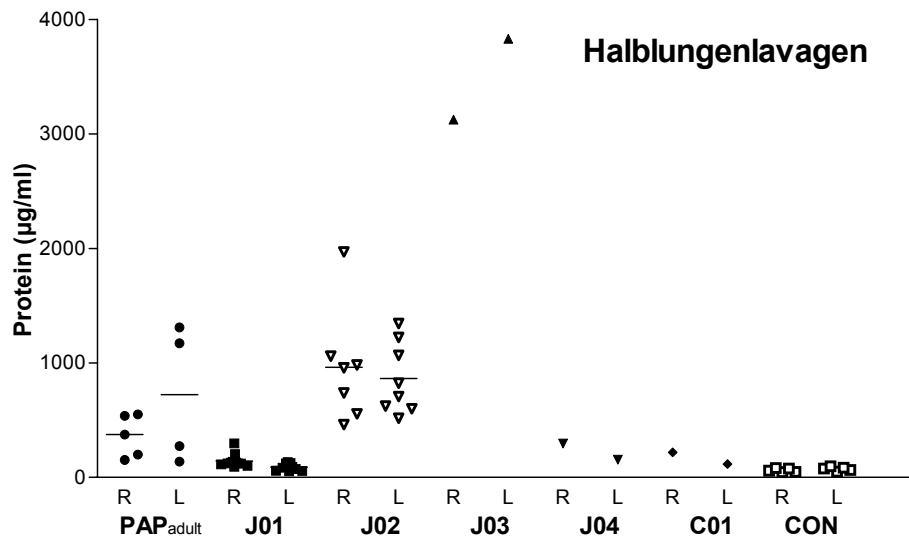


Abb. III.A.1.1.1.5.: Proteinkonzentration der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

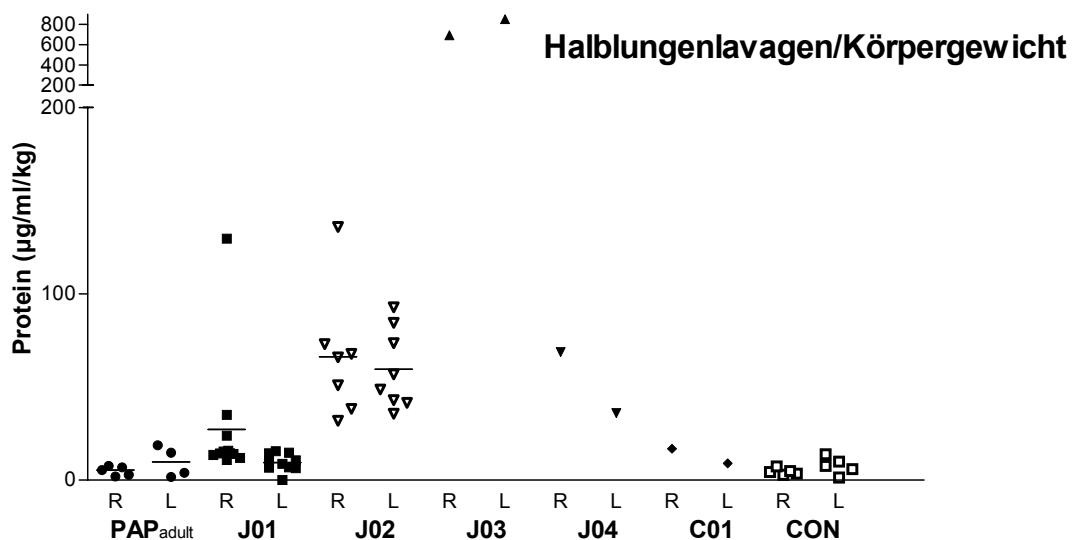


Abb. III.A.1.1.1.6.: Proteinkonzentration der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg/ml/kg. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p < 0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p > 0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

Die absolute Proteinkonzentration der Halblungenlavagen der juvenilen PAP Patienten war gegenüber den adulten Patienten nicht unterschiedlich, wohl aber die Proteinkonzentration bezogen auf das Körpergewicht. Bezogen auf das Körpergewicht zeigten sich keine Konzentrationsunterschiede der adulten PAP gegenüber den Kontrollpatienten, wohl aber absolut. Die juvenilen PAP Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant

III.A.1.1.2. Gesamtmenge

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge, welche bei Ganzlungenlavagen von PAP Patienten aus der Lunge gespült wird, wurden 4 juvenile und 6 adulte Patienten daraufhin untersucht. Die Ergebnisse wurden mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen. Die Gesamtproteinmenge in μg wurde als Produkt der Proteinkonzentration der Einzelflaschen mit den Volumina der Einzelflaschen ermittelt.

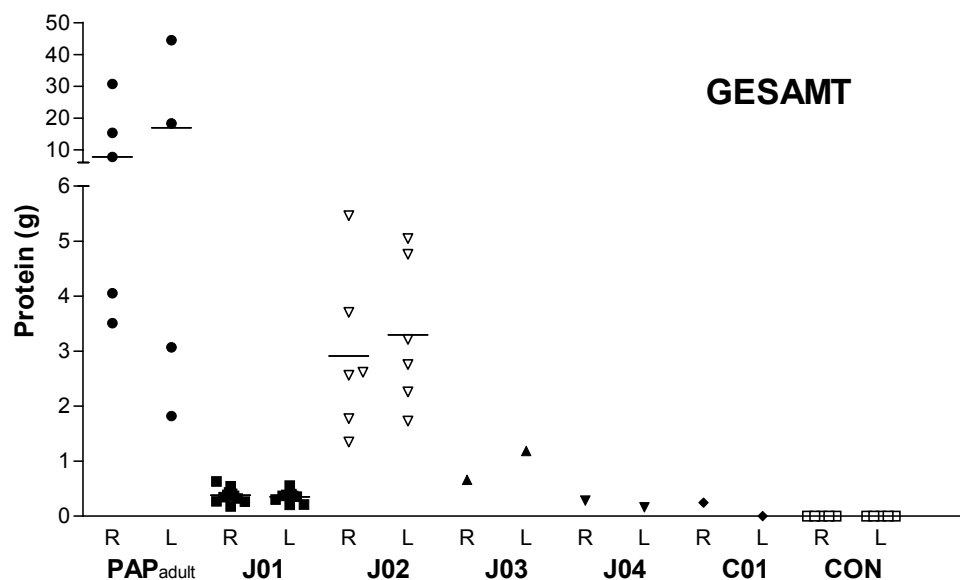


Abb. III.A.1.1.2.1.: Gesamtproteinmenge (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in g. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p < 0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

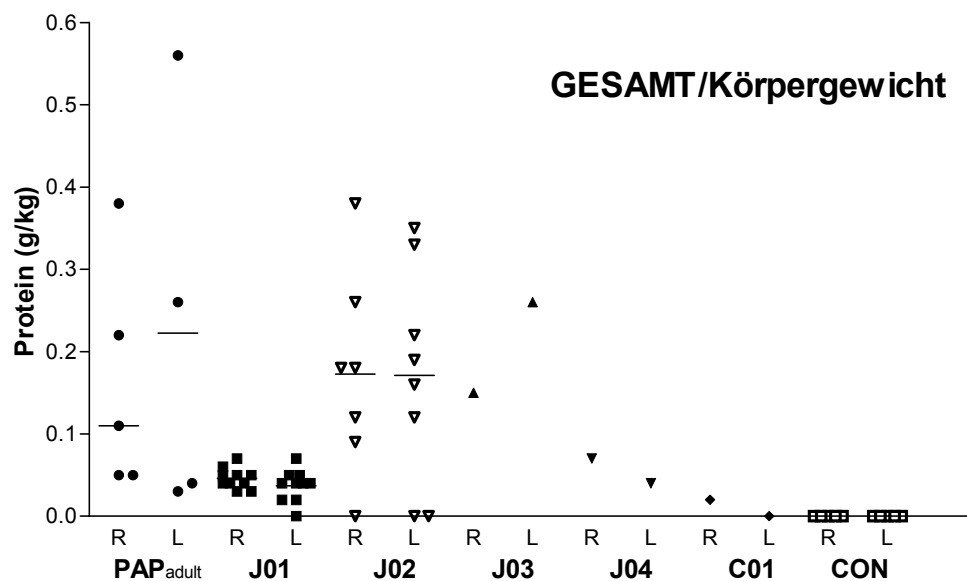


Abb. III.A.1.1.2.2.: Gesamtproteinmenge (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in g/kg Körpergewicht. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Proteinmenge je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,01$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bezogen auf das Körpergewicht in kg ist die ausgewaschene Gesamtproteinmenge der adulten PAP Patienten gegenüber den juvenilen PAP Patienten nicht signifikant erhöht, jedoch die absolut ausgespülte Menge an Protein schon. Die ausgespülte Proteinmenge der adulten und juvenilen PAP Patienten war gegenüber den Kontrollpatienten sowohl absolut als auch bezogen auf das Körpergewicht in kg signifikant erhöht. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können, und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

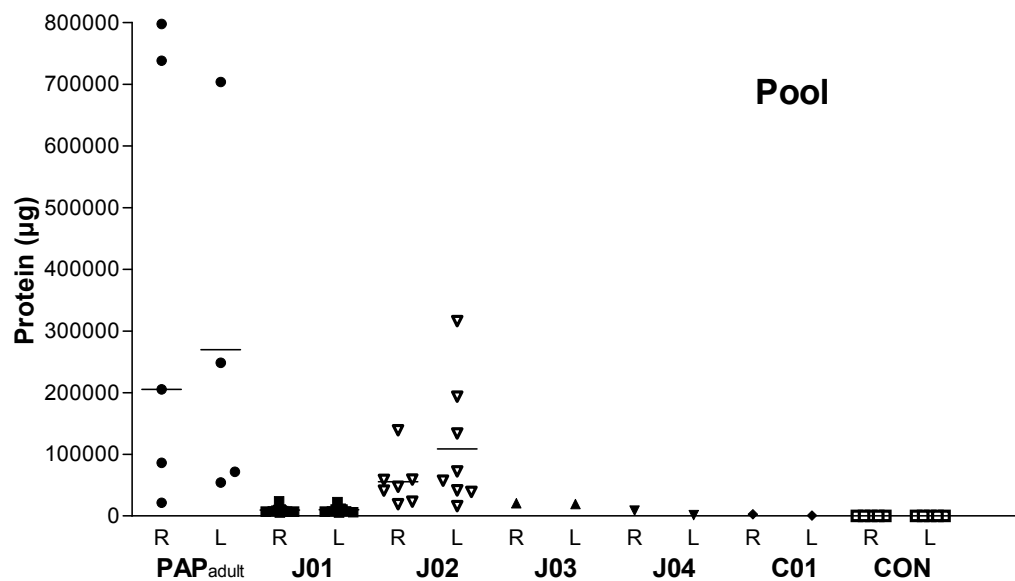


Abb. III.A.1.1.2.3.: Proteinmenge der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg. PAP adult entspricht 9 Pools der Patienten A01-A06. CON entspricht der Proteinmenge des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p < 0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

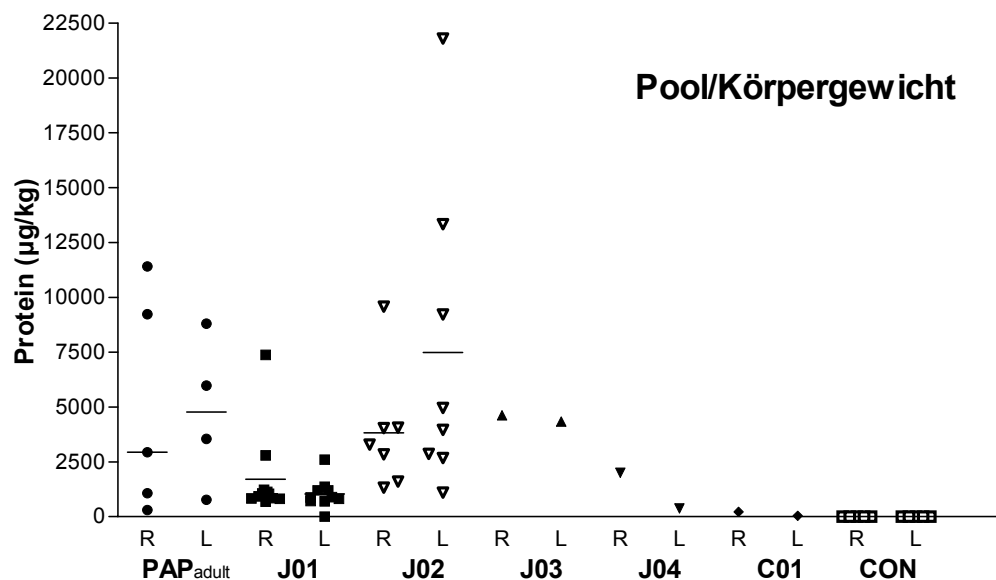


Abb. III.A.1.1.2.4.: Proteinmenge der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/kg. PAP adult entspricht 9 Pools der Patienten A01-A06. CON entspricht der Proteinmenge pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die ausgespülte Gesamtproteinmenge des Pools der adulten PAP Patienten ist, bezogen auf das Körpergewicht gegenüber den juvenilen Patienten, nicht signifikant erhöht. Betrachtet man allerdings die absolute Proteinmenge, zeigen die adulten Patienten signifikant höhere Werte. Sämtliche PAP Patienten hatten in der Pool Fraktion gegenüber den Kontrollpatienten stark erhöhte Gesamtproteinwerte. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

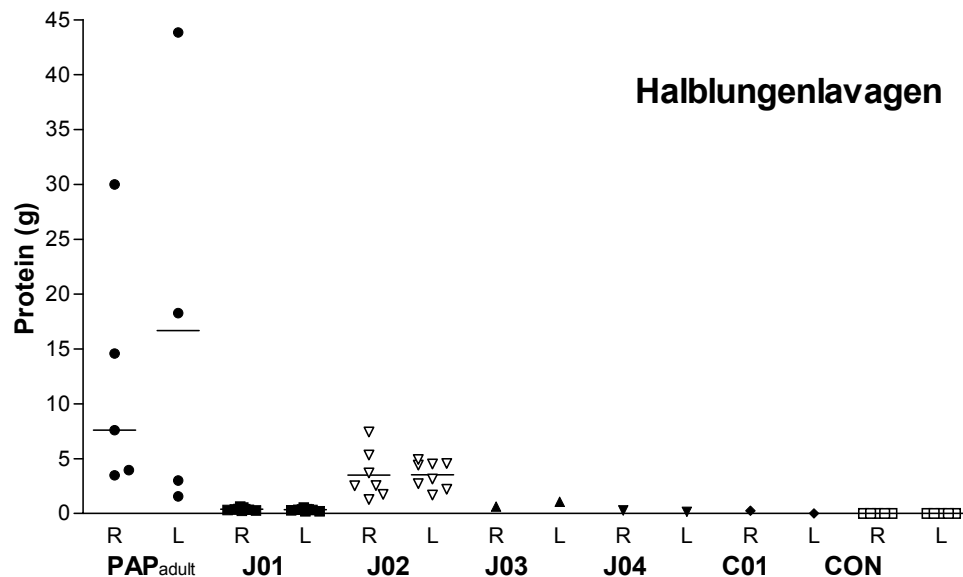


Abb. III.A.1.1.1.5.: Proteinmenge der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in g. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Proteinmenge der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p < 0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

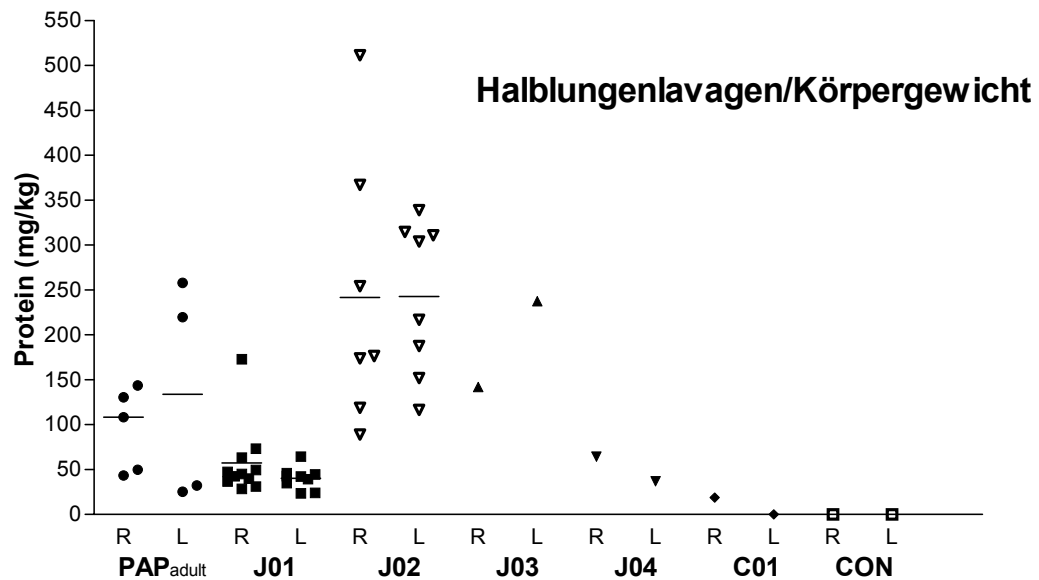


Abb. III.A.1.1.1.6.: Proteinmenge der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in mg/kg. PAP adult entspricht 9 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Proteinmenge pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

Die absolut ausgewaschene Proteinmenge der Halblungenlavagen der juvenilen PAP Patienten war gegenüber den adulten Patienten bezogen auf das Körpergewicht nicht erhöht, nur in der absoluten Betrachtung ergaben sich für die adulten Patienten erhöhte Werte. Juvenile und adulte Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

Zusammenfassung Gesamtgehaltsanalyse Protein

➤ **Konzentration:**

- Juvenile und adulte PAP Patienten zeigten, absolut betrachtet, die gleiche Proteinkonzentration in der Gesamtlavage. Auf das Körpergewicht bezogen, waren die Proteinkonzentrationen der juvenilen Patienten signifikant erhöht.
- Die Konzentration war bei allen PAP Patienten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Nur bezogen auf das Körpergewicht hatten die adulten Patienten die gleich Proteinkonzentration in der BAL wie die Kontrollen.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavage zeigte das gleiche Ergebnis wie die gesamte Lavage.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

➤ **Gesamtmenge:**

- Bei adulten PAP Patienten wurde insgesamt mehr Protein aus der Lunge gespült als bei juvenilen Patienten. Es gab jedoch bezogen auf das Körpergewicht keine Unterschiede.
- Bei adulten und juvenilen PAP Patienten wurde gegenüber den Kontrollpatienten signifikant mehr Protein aus der Lunge gespült.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavage zeigte das gleiche Ergebnis wie die gesamte Lavage.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

III.A.1.2. Phospholipide

III.A.1.2.1. Konzentration

Es wurden die bronchoalveolären Lavagen von 4 juvenilen und 4 adulten PAP Patienten hinsichtlich ihrer Phospholipidkonzentration und der Phospholipidkonzentration bezogen auf das Körpergewicht untersucht und mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen.

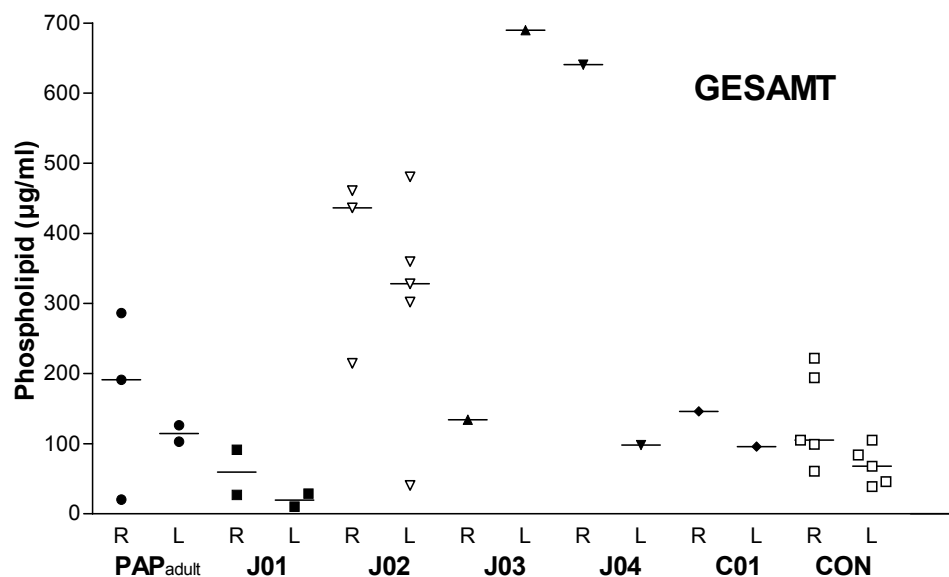


Abb. III.A.1.2.1.1.: Gesamtpospholipidkonzentration (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,2525$; Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

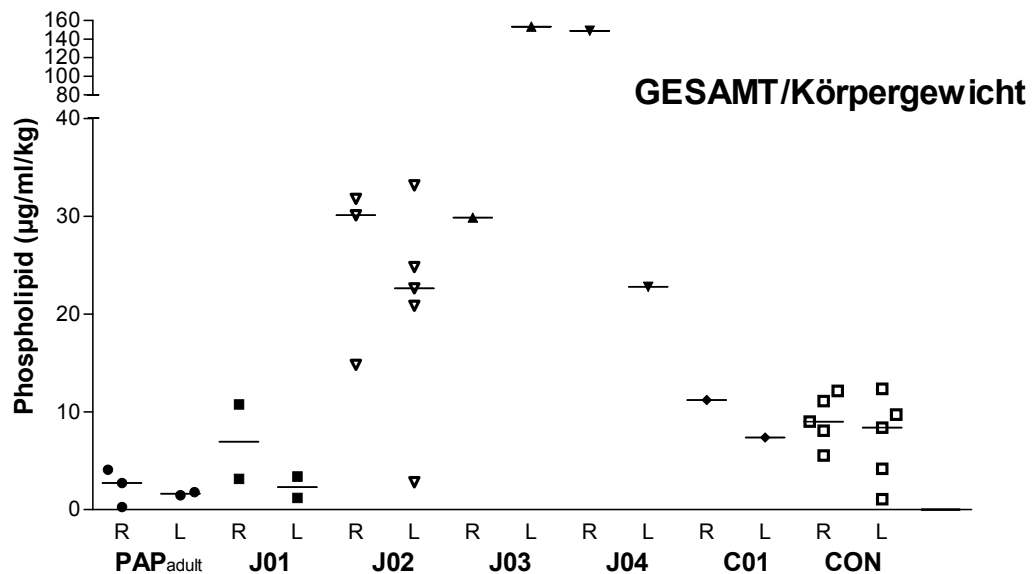


Abb. III.A.1.2.1.2.: Gesamtpospholipidkonzentration (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in $\mu\text{g/ml/kg}$ Körpergewicht. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0029$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p<0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bezogen auf das Körpergewicht in kg ist die Gesamtpospholipidkonzentration der juvenilen PAP Patienten gegenüber den adulten PAP Patienten signifikant erhöht. Betrachtet man allerdings die Gesamtkonzentration, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den juvenilen und adulten PAP Patienten. Sämtliche PAP Patienten hatten gegenüber Kontrollpatienten keine erhöhten Werte. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten mit einbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

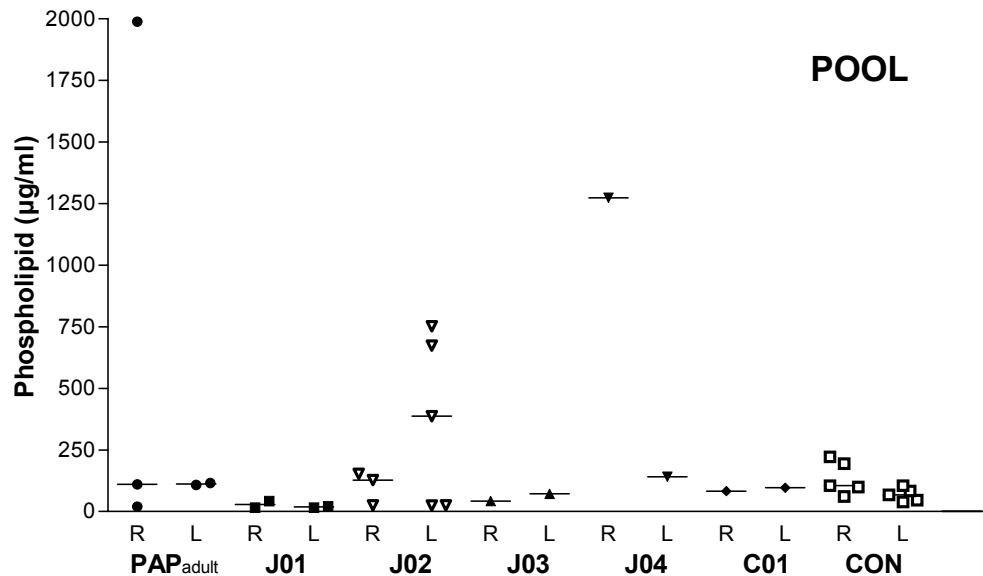


Abb. III.A.1.2.1.3.: Phospholipidkonzentration der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 5 Pools der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,7241$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang

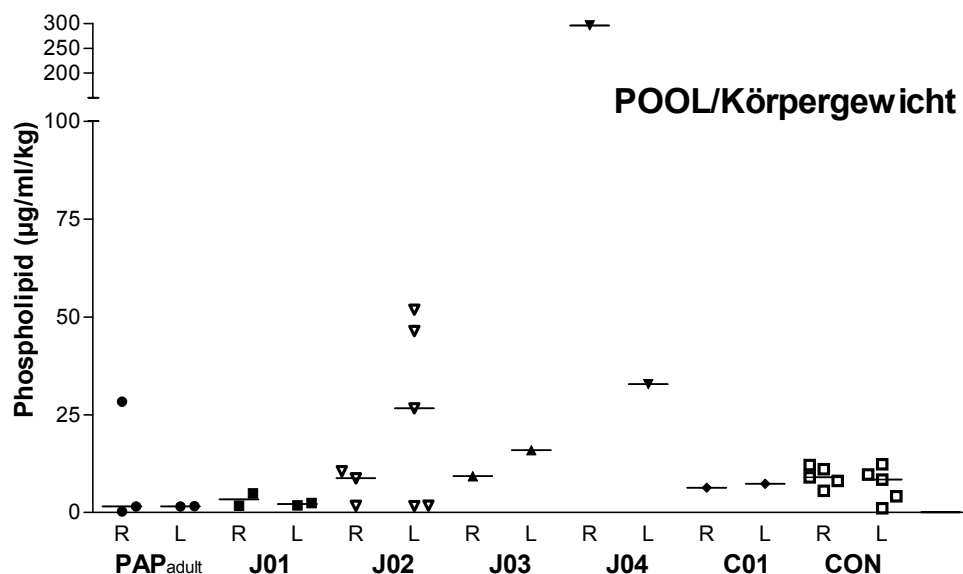


Abb. III.A.1.2.1.4.: Phospholipidkonzentration der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/ml/kg. PAP adult entspricht 5 Pools der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,1030$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

In der Phospholipidkonzentration des Pools zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den dargestellten Gruppen. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

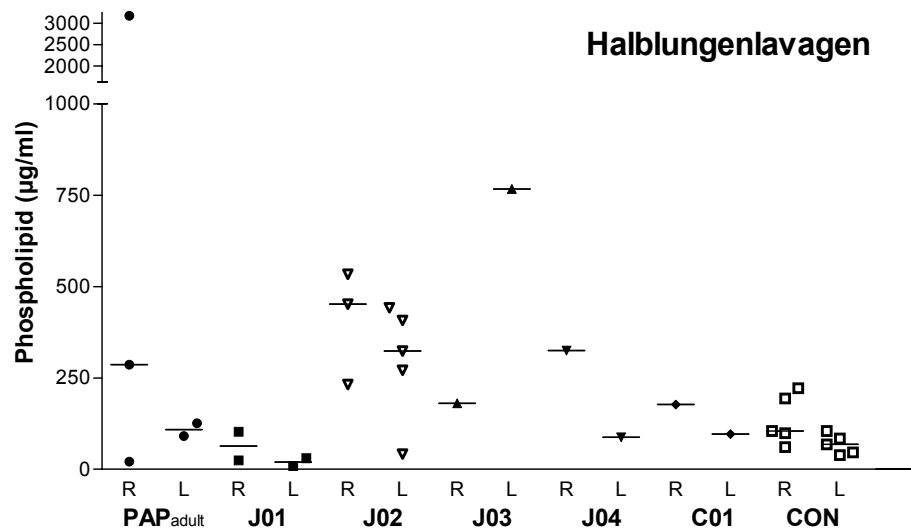


Abb. III.A.1.2.1.5.: Phospholipidkonzentration der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg/ml. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,2683$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

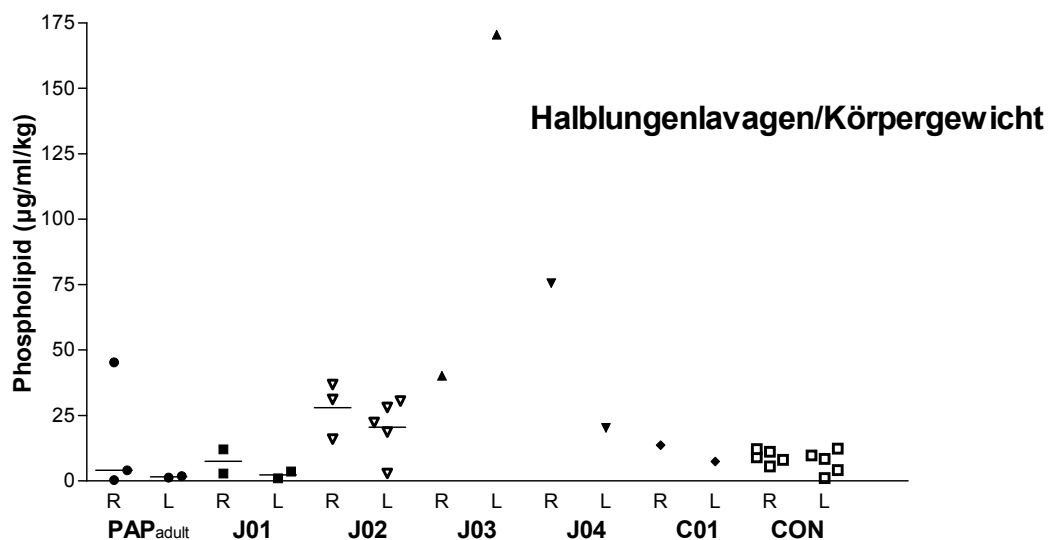


Abb. III.A.1.2.1.6.: Phospholipidkonzentration der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg/ml/kg. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test:

$p=0,1063$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p>0,05$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p>0,05$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

In der Phospholipidkonzentration der Halblungenlavagen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den dargestellten Gruppen. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

III.A.1.2.2. Gesamtmenge

Zur Bestimmung der Gesamtphospholipidmenge, welche bei Ganzlungenlavagen von PAP Patienten aus der Lunge gespült wird, wurden 4 juvenile und 4 adulte Patienten daraufhin untersucht. Die Ergebnisse wurden mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen. Die Gesamtproteinmenge in μg wurde als Produkt der Proteinkonzentration der Einzelflaschen mit den Volumina der Einzelflaschen ermittelt.

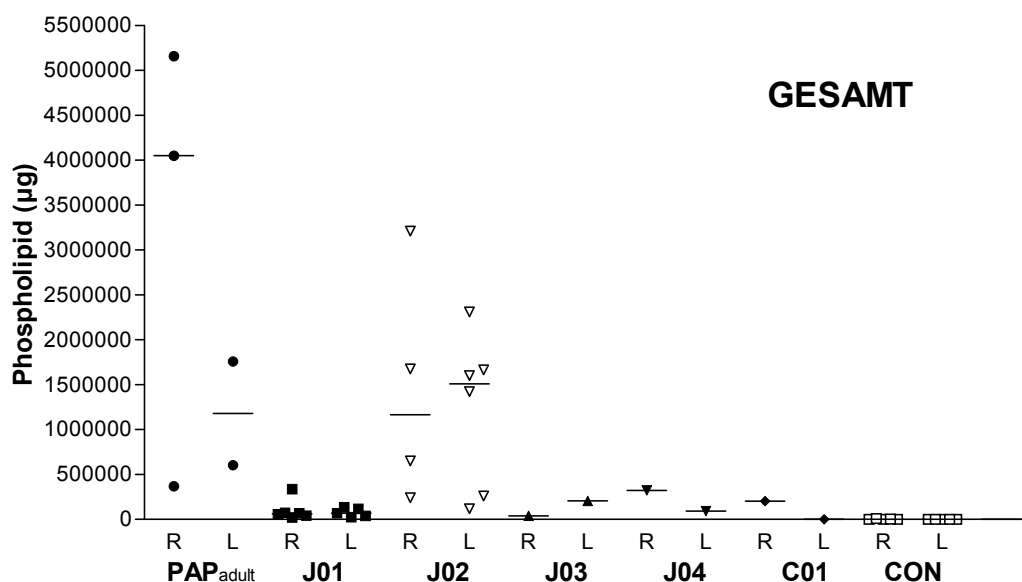


Abb. III.A.1.2.2.1.: Gesamtphospholipidmenge (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in μg . PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p<0,0001$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p<0,01$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p<0,001$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

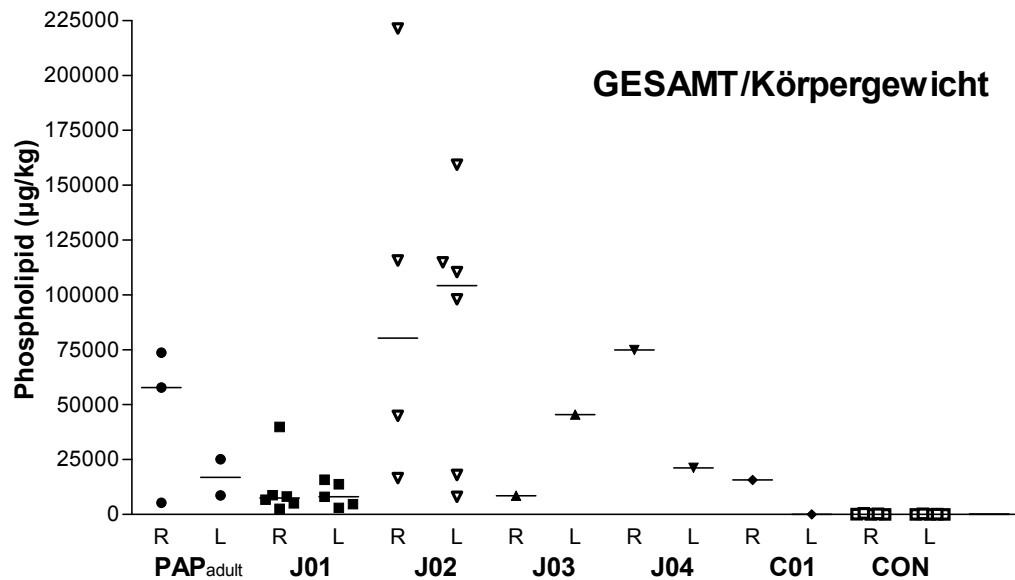


Abb. III.A.1.2.2.2.: Gesamtpospholipidmenge (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in µg/kg Körpergewicht. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A06. CON entspricht der Phospholipidmenge je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei adulten PAP Patienten wurde insgesamt mehr Phospholipid aus der Lunge gespült, als bei juvenilen Patienten. Bezogen auf das Körpergewicht gab es jedoch keine Unterschiede. Die ausgespülte Phospholipidmenge der adulten und juvenilen PAP Patienten war jedoch gegenüber den Kontrollpatienten sowohl absolut als auch bezogen auf das Körpergewicht in kg signifikant erhöht. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

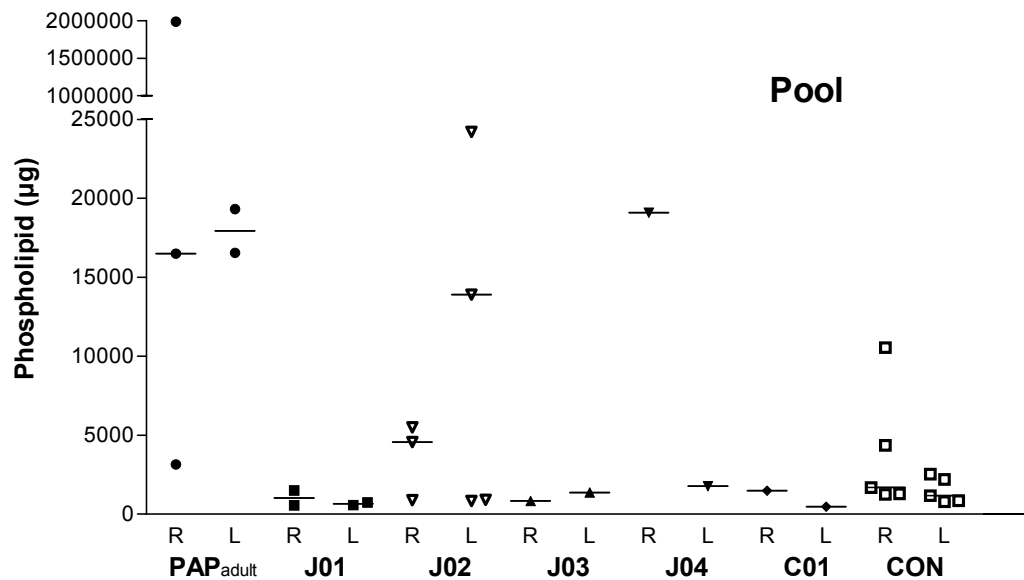


Abb. III.A.1.2.2.3.: Phospholipidmenge der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg. PAP adult entspricht 5 Pools der Patienten A01-A04. CON entspricht der Phospholipidmenge des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0308$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p<0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p<0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

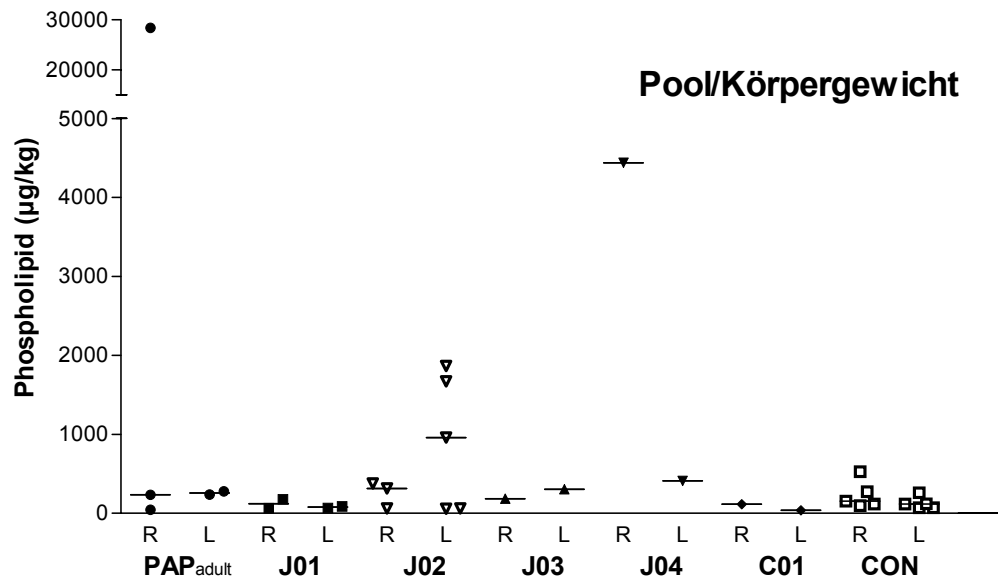


Abb. III.A.1.2.2.4.: Phospholipidmenge der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in µg/kg. PAP adult entspricht 5 Pools der Patienten A01-A04. CON entspricht der Phospholipidmenge pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,7410$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die ausgespülte Gesamtpospholipidmenge des Pools der adulten PAP Patienten ist, bezogen auf das Körpergewicht gegenüber den juvenilen Patienten nicht signifikant erhöht. Betrachtet man allerdings die absolute Phospholipidmenge, zeigen die adulten Patienten signifikant höhere Werte. Die juvenilen PAP Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen keine signifikante Differenzierung gegenüber den Kontrollen. Die adulten Patienten zeigten nur in der absoluten Darstellung gegenüber den Kontrollen signifikant höhere Werte, auf das kg Körpergewicht berechnet unterschieden sie sich nicht. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

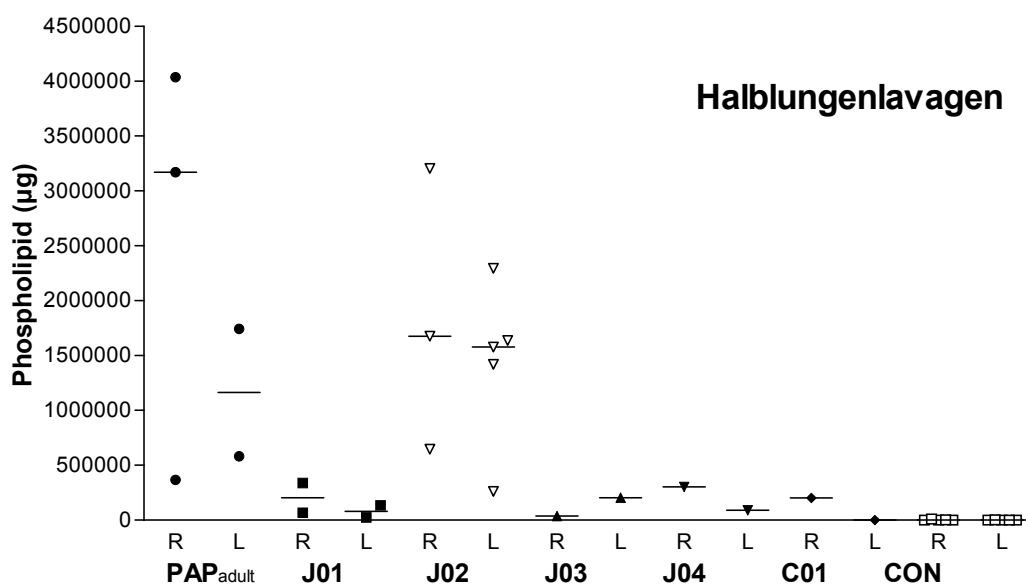


Abb. III.A.1.2.2.5.: Phospholipidmenge der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Phospholipidmenge der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

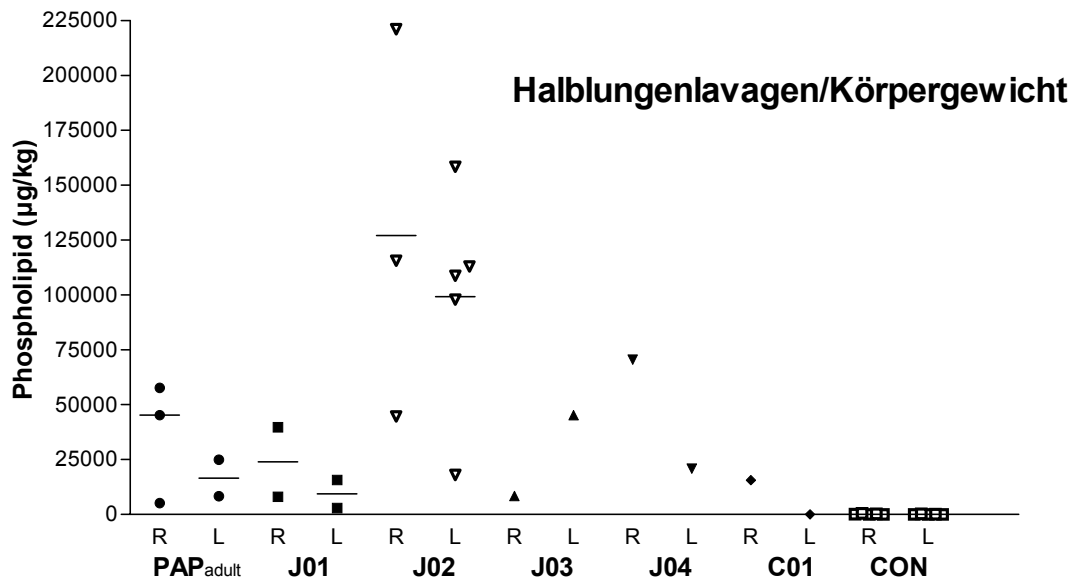


Abb. III.A.1.2.2.6.: Phospholipidmenge der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in µg/kg. PAP adult entspricht 5 Halblungenlavagen der Patienten A01-A04. CON entspricht der Phospholipidmenge pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Sowohl die absolut ausgewaschene Phospholipidmenge als auch die Phospholipidmenge, berechnet auf das Körpergewicht, war bei juvenilen PAP Patienten und adulten PAP Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Juvenile und adulte Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

Zusammenfassung Gesamtgehaltsanalyse Phospholipid

➤ **Konzentration:**

- Juvenile PAP Patienten haben, auf das Körpergewicht bezogen, gegenüber den adulten Patienten signifikant erhöhte Phospholipidkonzentrationen in der Lavage. Wird allerdings die Gesamtkonzentration betrachtet, zeigen sich keine Unterschiede zwischen adulten und juvenilen Patienten.
- Die Konzentration absolut, als auch die Konzentration auf das Körpergewicht bezogen, war bei allen PAP Patienten gegenüber den Kontrollpatienten nicht signifikant erhöht.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavagen zeigte zwischen den einzelnen Patientengruppen keine Unterschiede.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

➤ **Gesamtmenge:**

- Bei adulten PAP Patienten wurde insgesamt mehr Phospholipid aus der Lunge gespült, als bei juvenilen Patienten. Bezogen auf das Körpergewicht gab es jedoch keine Unterschiede.
- Bei adulten und juvenilen PAP Patienten wurde gegenüber den Kontrollpatienten signifikant mehr Phospholipid aus der Lunge gespült.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavagen zeigte für die Halblungenlavagen das gleiche Ergebnis. Betrachtet man allerdings den Pool, haben die adulten Patienten absolut mehr Phospholipid in der Lunge. Bezogen auf das Körpergewicht gab es keine Unterschiede. Bei den juvenilen Patienten gab es keine Unterschiede zu den Kontrollen, nur die adulten Patienten zeigten absolut berechnet gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Werte.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

III.A.1.3. SP-A

III.A.1.3.1. Konzentration

Es wurden die bronchoalveolären Lavagen von 4 juvenilen und 3 adulten PAP Patienten hinsichtlich ihrer SP-A Konzentration und der SP-A Konzentration bezogen auf das Körpergewicht untersucht und mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen.

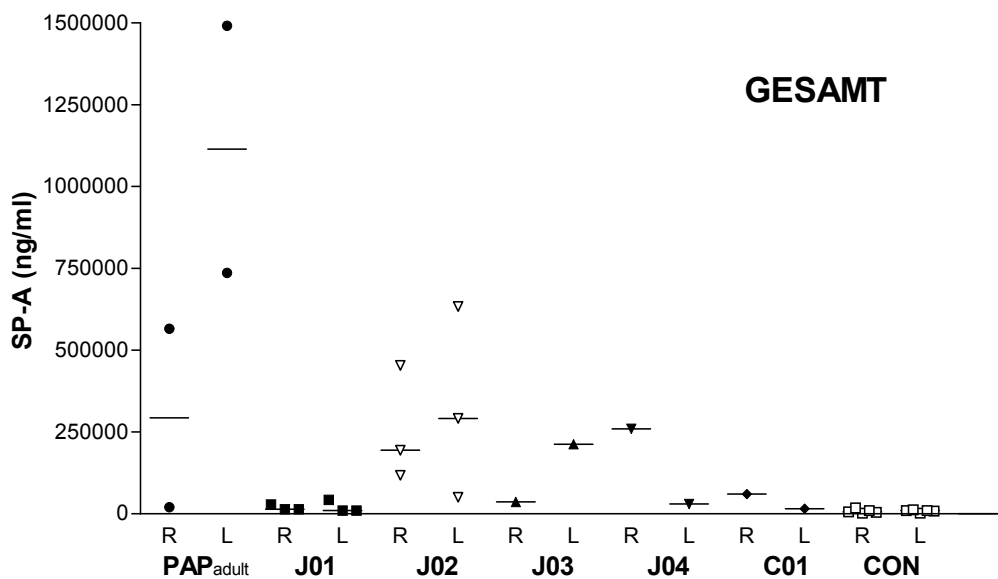


Abb. III.A.1.3.1.1.: SP-A Konzentration (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0001$; Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p<0,01$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p<0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p<0,01$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

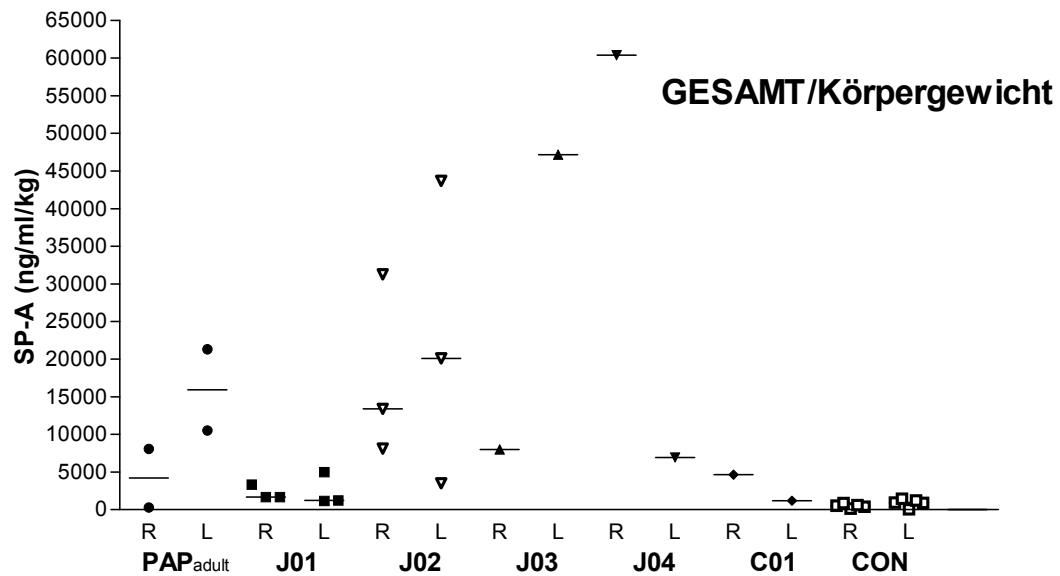


Abb. III.A.1.3.1.2.: SP-A Konzentration (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/ml/kg Körpergewicht. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,005$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p>0,05$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p>0,05$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Absolut war die Konzentration von SP-A bei adulten Patienten im Vergleich zu juvenilen Patienten signifikant erhöht. Zwischen den juvenilen und adulten PAP Patienten zeigten sich, bezogen auf das Körpergewicht in kg keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Bei sämtlichen PAP Patienten waren die SP-A Konzentrationen gegenüber Kontrollpatienten signifikant erhöht, nur bezogen auf das Körpergewicht waren die Werte der adulten Patienten ebenso hoch wie die der Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

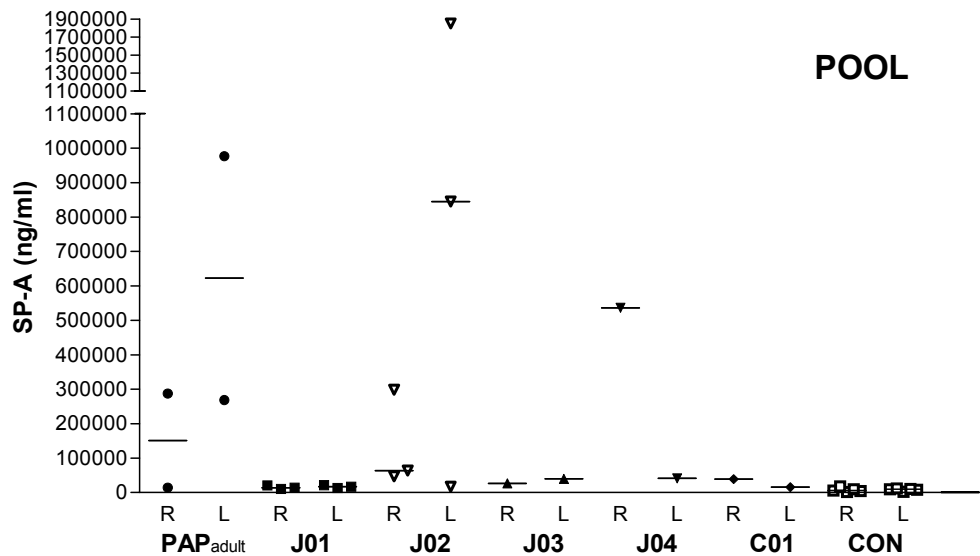


Abb. III.A.1.3.1.3.: SP-A Konzentration der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0002$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p<0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

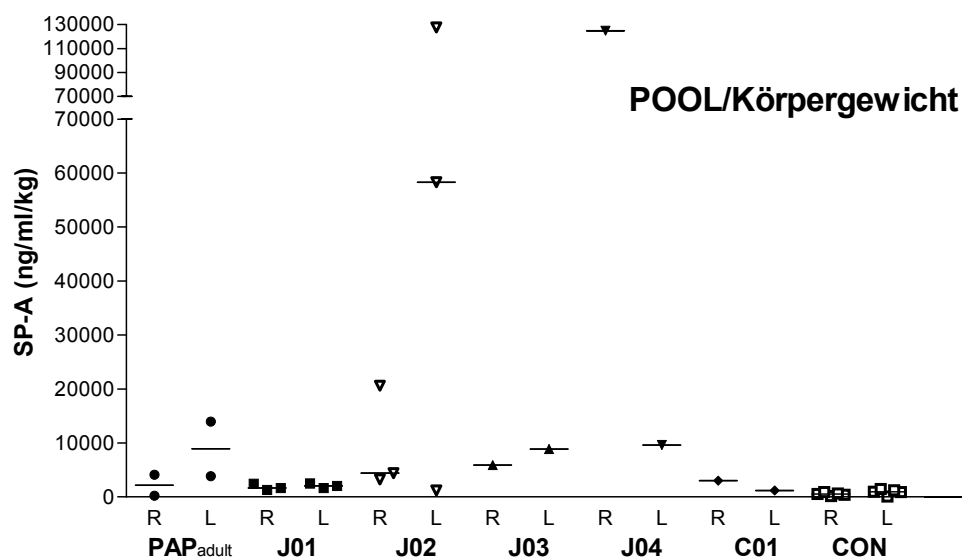


Abb. III.A.1.3.1.4.: SP-A Konzentration der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/ml/kg. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0004$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

In beiden Darstellungsweisen waren zwischen den adulten und juvenilen Patienten keine signifikanten Unterschiede feststellbar und die juvenilen Patienten hatten

erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Insgesamt war die Konzentration der adulten Patienten gegenüber den Kontrollpatienten erhöht, jedoch bezogen auf das Körpergewicht ergaben sich keine erhöhten Werte. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

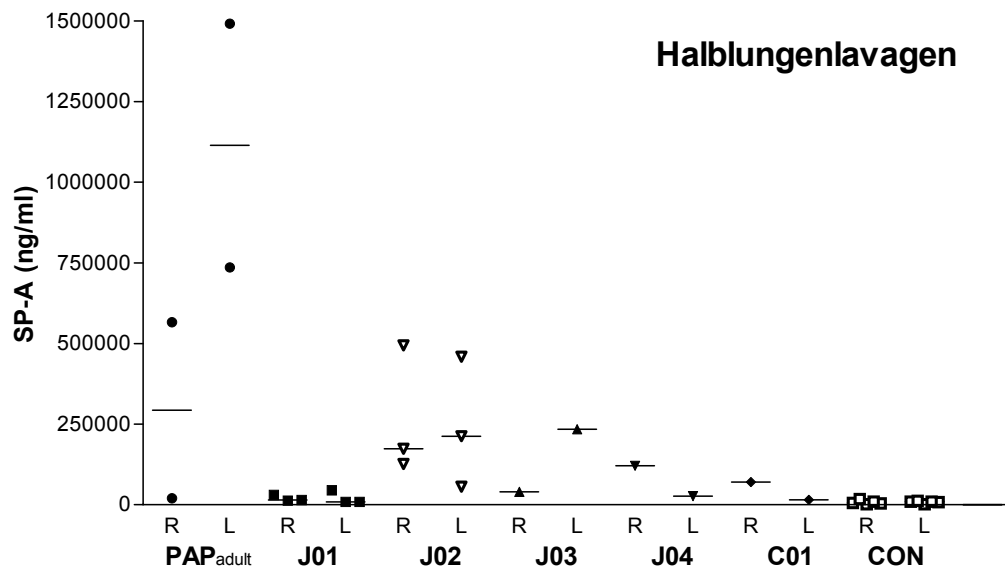


Abb. III.A.1.3.1.5.: SP-A Konzentration der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0002$, Dunn's post hoc Test: $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{PAP}_{\text{juvenil}}$: $p>0,05$, $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{Kontrollen}$: $p<0,001$, $\text{PAP}_{\text{juvenil}}/\text{Kontrollen}$: $p<0,01$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

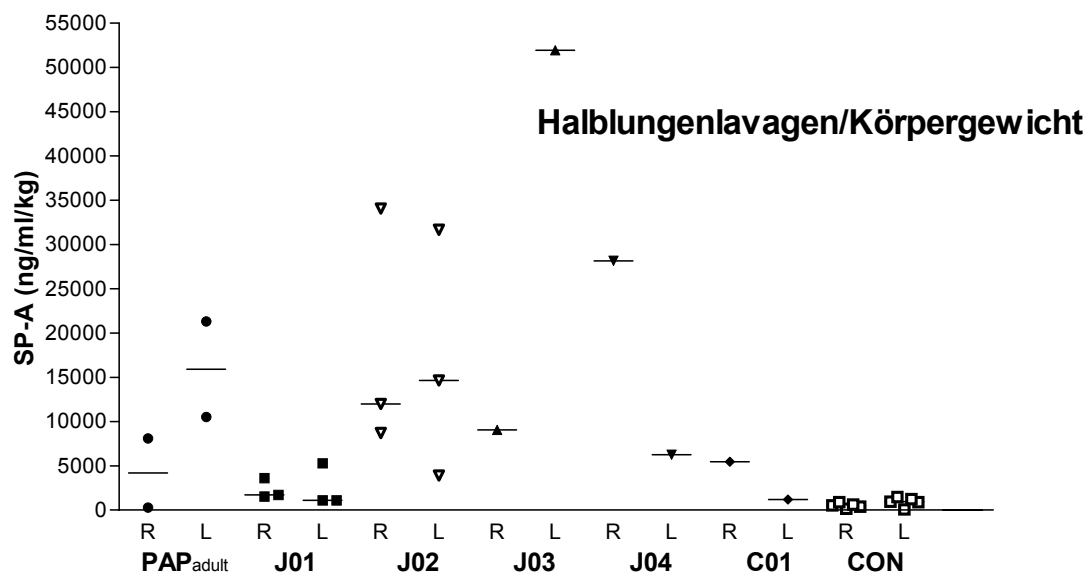


Abb. III.A.1.3.1.6.: SP-A Konzentration der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/ml/kg. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der

Konzentration pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p > 0,05$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p > 0,05$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

In beiden Darstellungsweisen waren zwischen den adulten und juvenilen Patienten keine signifikanten Unterschiede feststellbar und die juvenilen Patienten hatten erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Insgesamt war auch die Konzentration der adulten Patienten gegenüber den Kontrollpatienten erhöht, jedoch bezogen auf das Körpergewicht ergaben sich keine erhöhten Werte. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

III.A.1.3.2. Gesamtmenge

Zur Bestimmung der gesamten SP-A Menge, welche bei Ganzlungenlavagen von PAP Patienten aus der Lunge gespült wird, wurden 4 juvenile und 3 adulte Patienten daraufhin untersucht. Die Ergebnisse wurden mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen. Die SP-A Menge in ng wurde als Produkt der Proteinkonzentration der Einzelflaschen mit den Volumina der Einzelflaschen ermittelt.

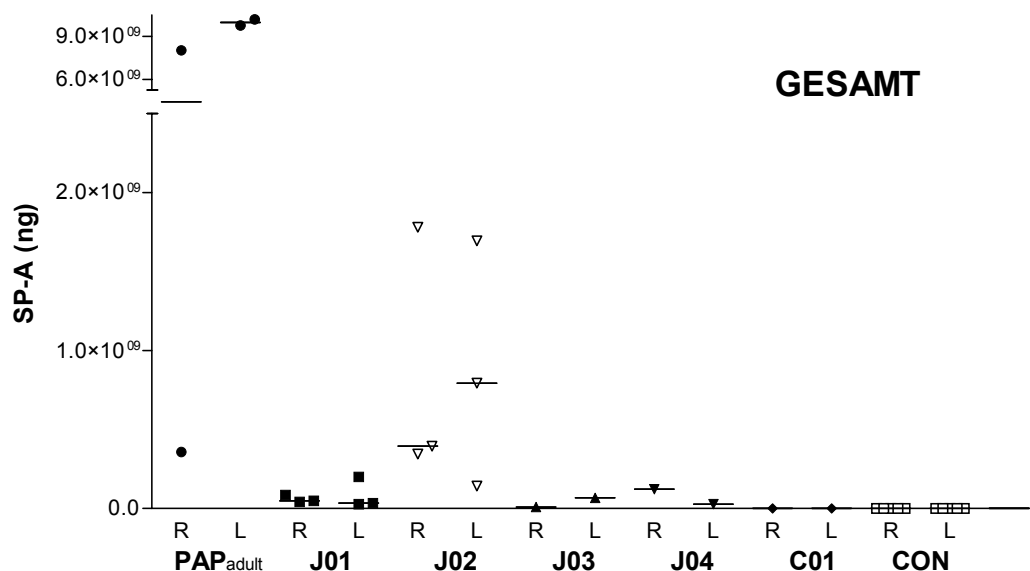


Abb. III.A.1.3.2.1.: SP-A Menge (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p < 0,01$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p < 0,001$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

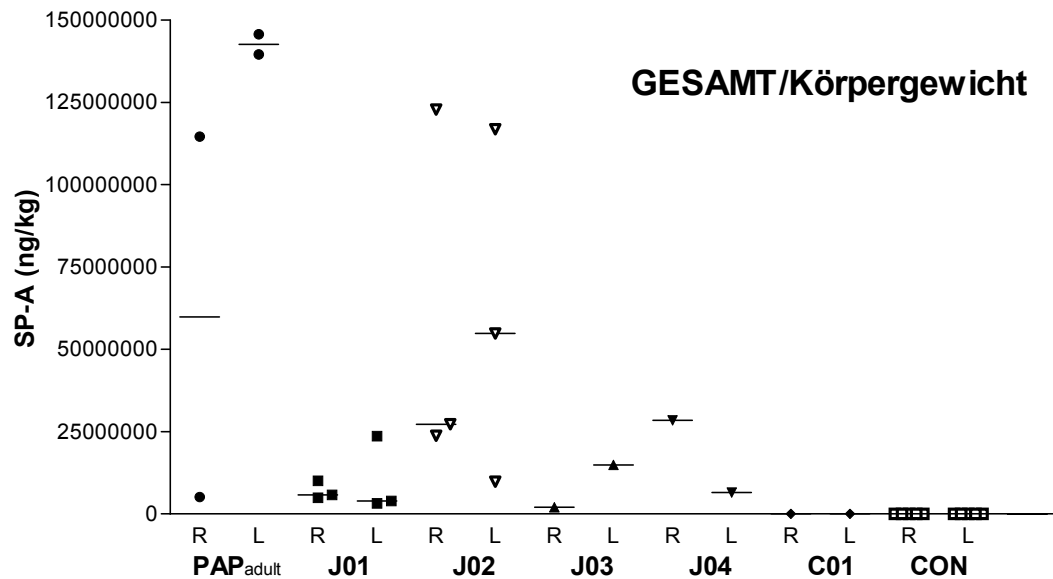


Abb. III.A.1.3.2.2.: SP-A Menge (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/kg Körpergewicht. PAP_{adult} entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-A Menge je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bezogen auf das Körpergewicht in kg war die gesamte ausgewaschene SP-A Menge der adulten PAP Patienten gegenüber den juvenilen PAP Patienten nicht signifikant erhöht. Absolut enthielten die adulten Lavagen signifikant mehr SP-A. Die ausgespülte SP-A Menge der adulten und juvenilen PAP Patienten war jedoch gegenüber den Kontrollpatienten sowohl absolut als auch bezogen auf das Körpergewicht in kg signifikant erhöht. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

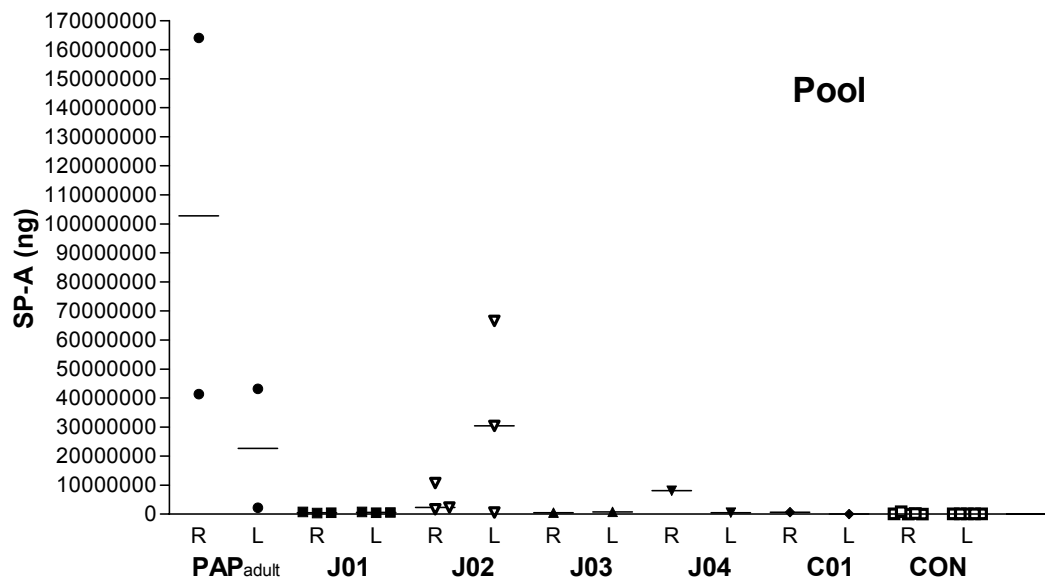


Abb. III.A.1.3.2.3.: SP-A Menge der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-A Menge des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{PAP}_{\text{juvenil}}$: $p > 0,05$, $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{Kontrollen}$: $p < 0,01$, $\text{PAP}_{\text{juvenil}}/\text{Kontrollen}$: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

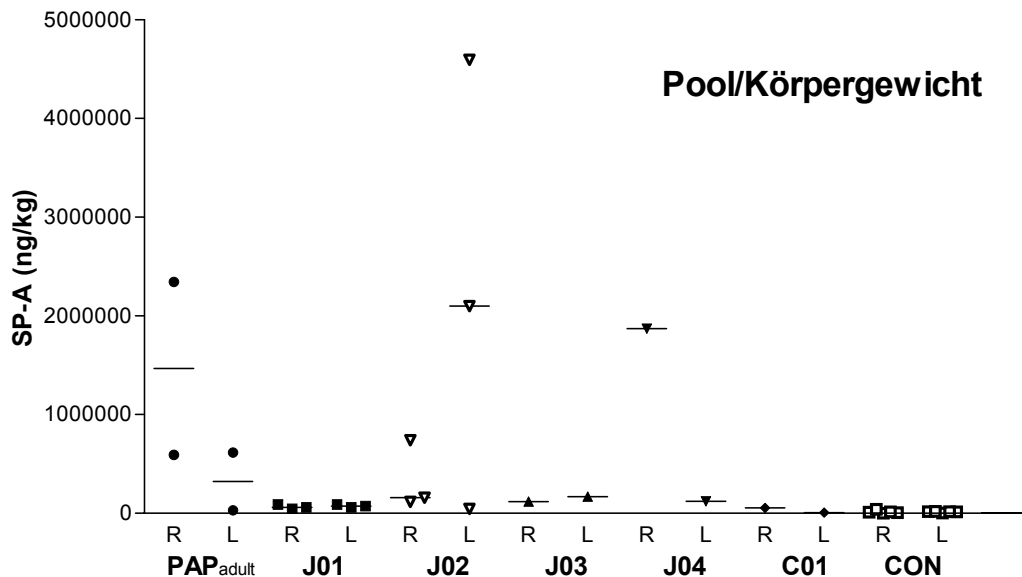


Abb. III.A.1.3.2.4.: SP-A Menge der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/kg. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-A Menge pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{PAP}_{\text{juvenil}}$: $p > 0,05$, $\text{PAP}_{\text{adult}}/\text{Kontrollen}$: $p < 0,01$, $\text{PAP}_{\text{juvenil}}/\text{Kontrollen}$: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die ausgespülte, gesamte SP-A Menge des Pools der adulten PAP Patienten ist in beiden Darstellungsweisen gegenüber den juvenilen Patienten nicht signifikant

erhöht. Sämtliche PAP Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant höhere Werte in ihren Poolfraktionen als die Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

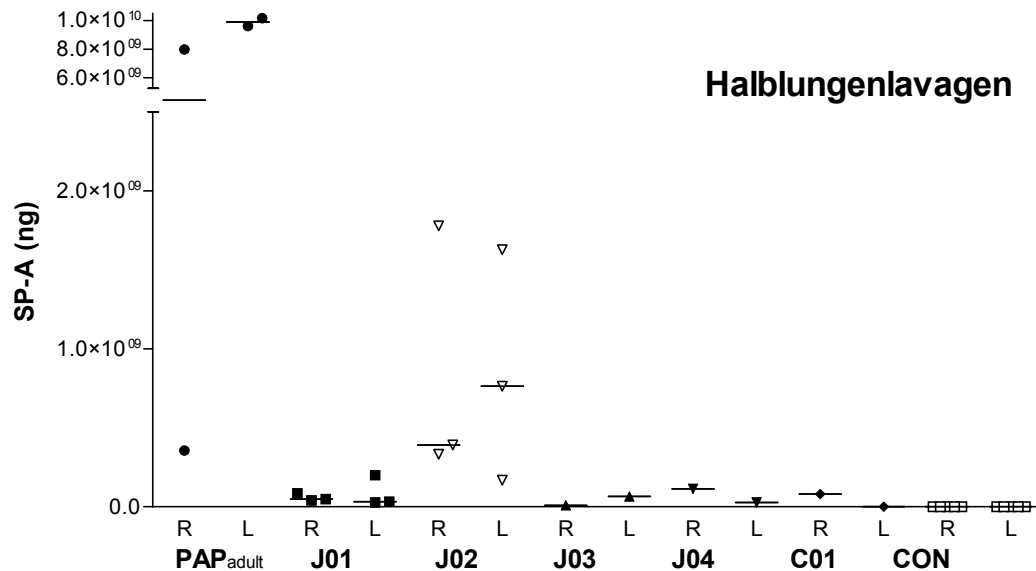


Abb. III.A.1.3.2.5.: SP-A Menge der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-A Menge der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

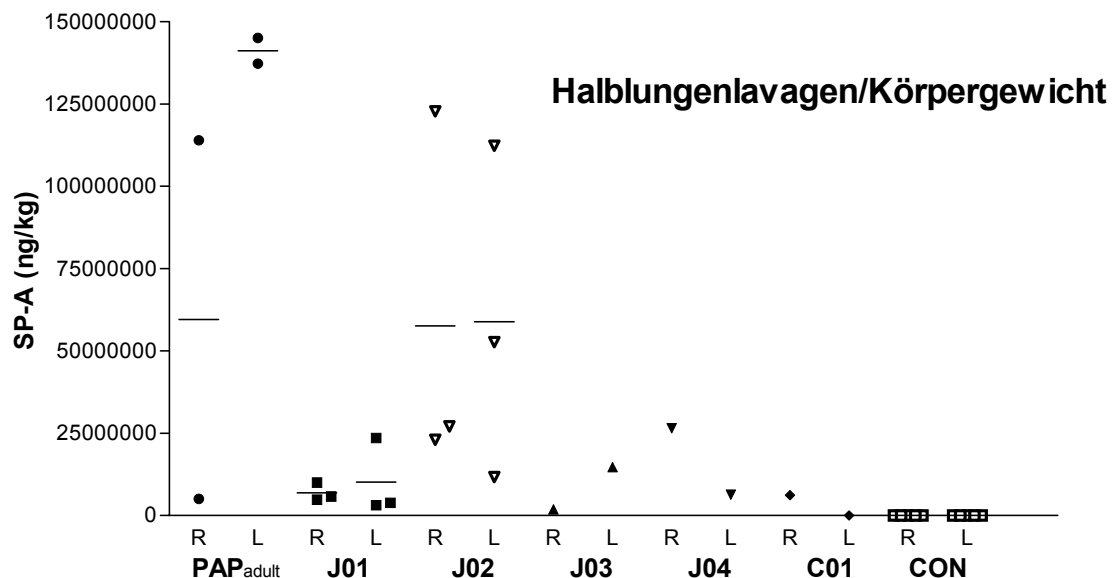


Abb. III.A.1.3.2.6.: SP-A Menge der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/kg. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-A Menge pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,001$, Dunn's post hoc Test:

$PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p>0,05$, $PAP_{adult}/Kontrollen$: $p<0,001$, $PAP_{juvenil}/Kontrollen$: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Sowohl die absolut ausgewaschene SP-A Menge als auch die SP-A Menge, berechnet auf das Körpergewicht, war zwischen juvenilen PAP Patienten und adulten PAP Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Juvenile und adulte Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

Zusammenfassung Gesamtgehaltsanalyse SP-A

➤ **Konzentration:**

- Absolut war die Konzentration von SP-A bei adulten Patienten im Vergleich zu juvenilen Patienten signifikant erhöht. Zwischen den juvenilen und adulten PAP Patienten zeigten sich, bezogen auf das Körpergewicht in kg keine signifikanten Konzentrationsunterschiede.
- Die Konzentration absolut, als auch die Konzentration auf das Körpergewicht bezogen war bei allen PAP Patienten gegenüber den Kontrollpatienten signifikant erhöht. Nur bezogen auf das Körpergewicht waren die Werte der adulten Patienten ebenso hoch wie die, der Kontrollen.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavagen zeigte zwischen den einzelnen Patientengruppen keine Unterschiede.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

➤ **Gesamtmenge:**

- Bezogen auf das Körpergewicht in kg war die ausgewaschene SP-A Menge der adulten PAP Patienten und der juvenilen Patienten gleich hoch. Absolut enthielten die adulten Lavagen signifikant mehr SP-A.
- Bei adulten und juvenilen PAP Patienten wurde gegenüber den Kontrollpatienten signifikant mehr SP-A aus der Lunge gespült.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavagen zeigte für die Halblungenlavagen das gleiche Ergebnis.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

III.A.1.4. SP-D

III.A.1.4.1. Konzentration

Es wurden die bronchoalveolären Lavagen von 4 juvenilen und 3 adulten PAP Patienten hinsichtlich ihrer SP-D Konzentration und der SP-D Konzentration bezogen auf das Körpergewicht untersucht und mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen.

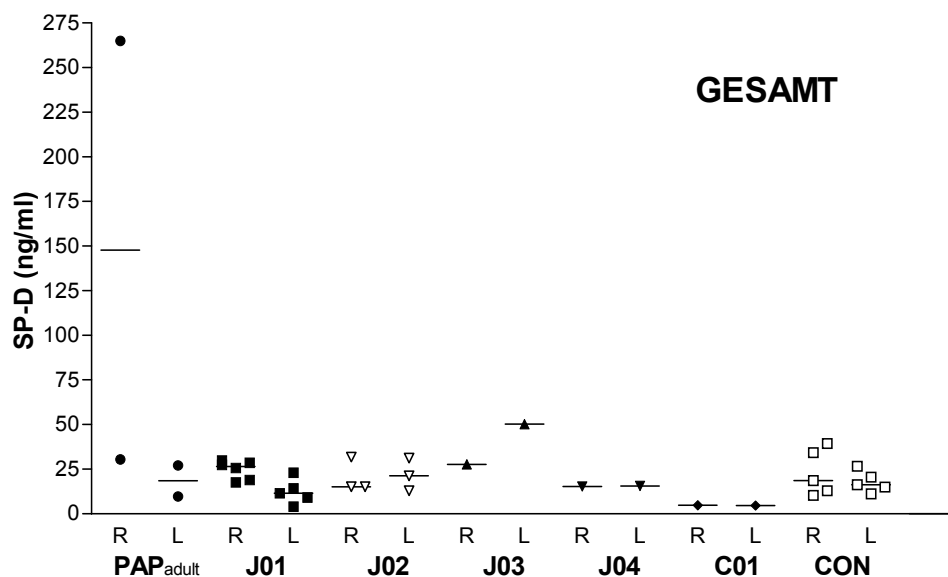


Abb. III.A.1.4.1.1.: SP-D Konzentration (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,5836$; Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

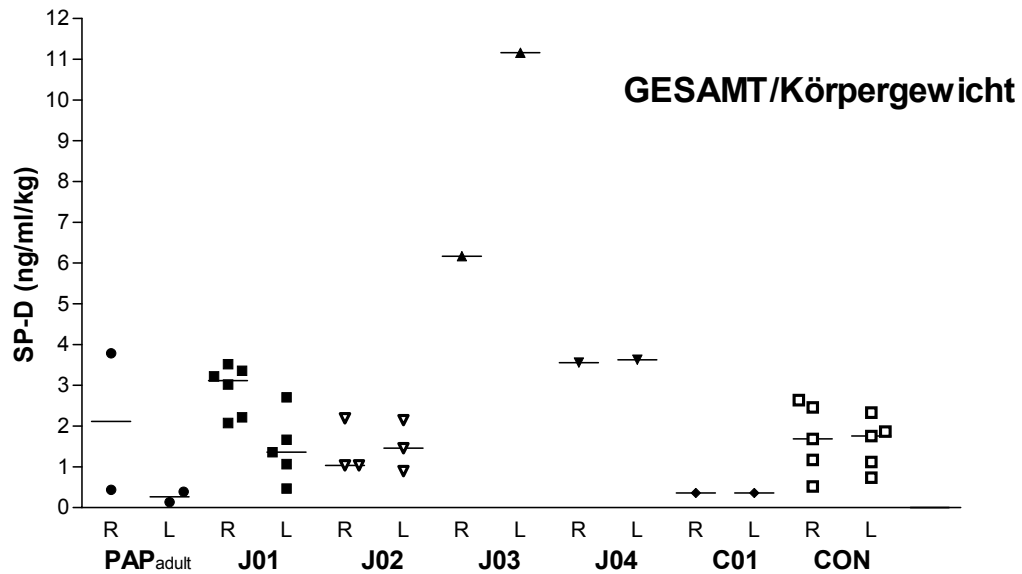


Abb. III.A.1.4.1.2.: SP-D Konzentration (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/ml/kg Körpergewicht. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,1044$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Zwischen den juvenilen und adulten PAP Patienten zeigten sich keine signifikante Unterschiede in der SP-D Konzentration der Lavage. Bezogen auf das Körpergewicht zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch waren die juvenilen Werte erhöht. Die Konzentration absolut, als auch die Konzentration auf das Körpergewicht bezogen, war bei allen PAP Patienten ebenso hoch wie bei den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

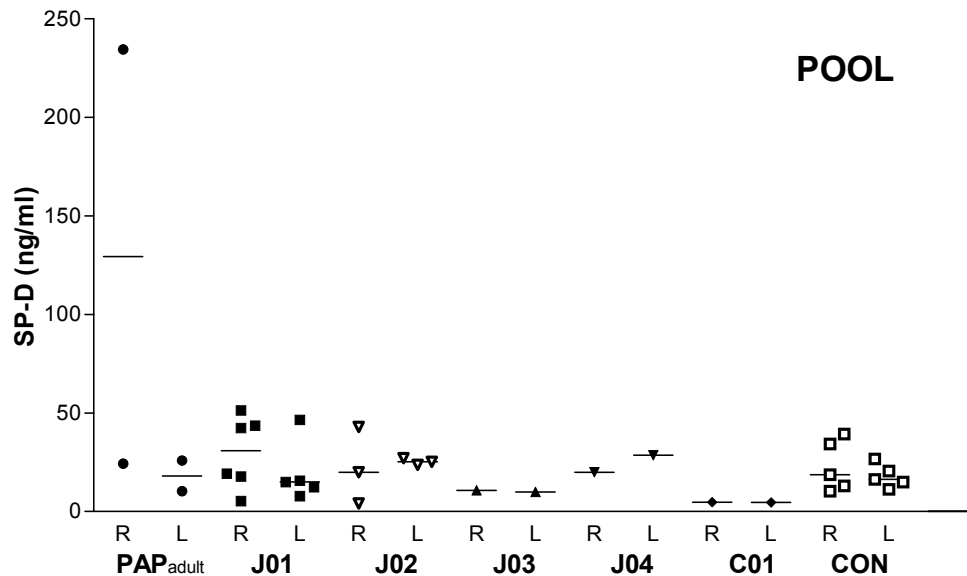


Abb. III.A.1.4.1.3.: SP-D Konzentration der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,7221$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

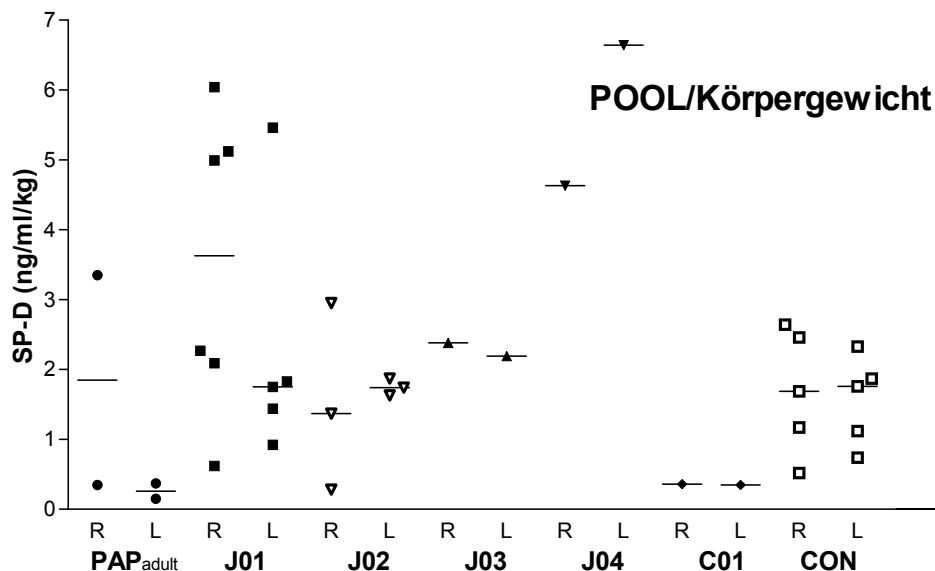


Abb. III.A.1.4.1.4.: SP-D Konzentration der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/ml/kg. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0905$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es zeigten sich in beiden Darstellungsweisen keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Pools der untersuchten Gruppen. Die durchschnittliche SP-D Konzentration der Pools war bei adulten und juvenilen PAP Patienten, sowie den Kontrollpatienten gleich hoch. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

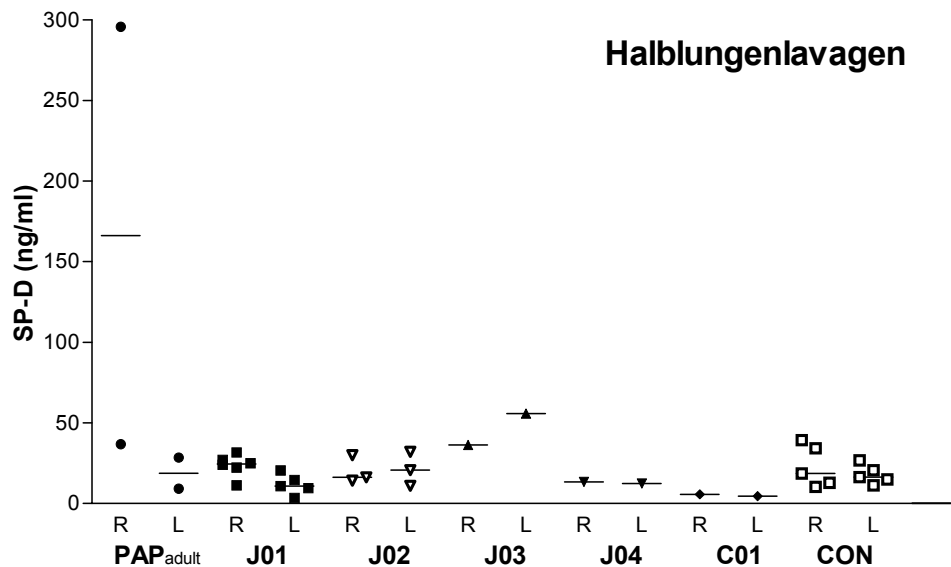


Abb. III.A.1.4.1.5.: SP-D Konzentration der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/ml. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,4891$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

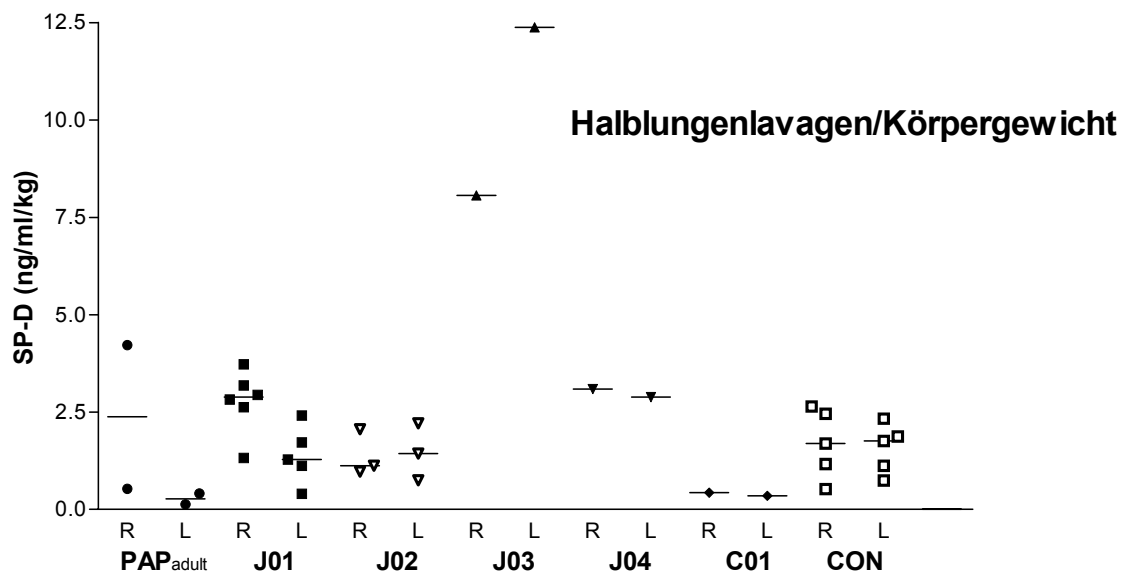


Abb. III.A.1.4.1.6.: SP-D Konzentration der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration

der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/ml/kg. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,1407$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p>0,05$, $PAP_{adult}/\text{Kontrollen}$: $p>0,05$, $PAP_{juvenil}/\text{Kontrollen}$: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

In der SP-D Konzentration der Halblungenlavagen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den dargestellten Gruppen. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant.

III.A.1.4.2. Gesamtmenge

Zur Bestimmung der gesamten SP-D Menge, welche bei Ganzlungenlavagen von PAP Patienten aus der Lunge gespült wird, wurden 4 juvenile und 3 adulte Patienten daraufhin untersucht. Die Ergebnisse wurden mit 10 gesunden Kontrollpatienten und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis verglichen. Die SP-D Menge in ng wurde als Produkt der Proteinkonzentration der Einzelflaschen mit den Volumina der Einzelflaschen ermittelt.

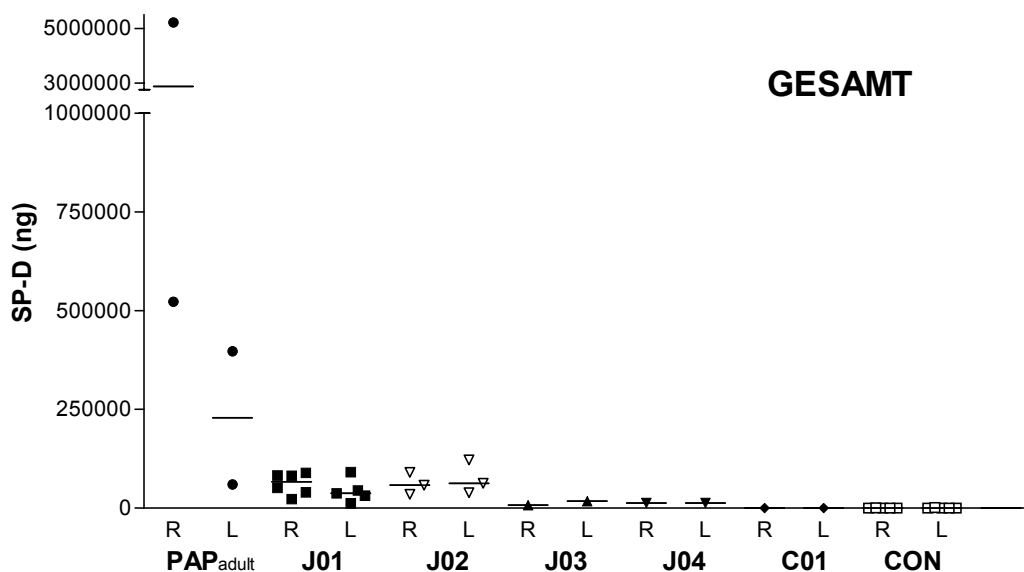


Abb. III.A.1.4.2.1.: SP-D Menge (diagnostische und therapeutische BAL), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der Konzentration des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p<0,0001$, Dunn's post hoc Test $PAP_{adult}/PAP_{juvenil}$: $p<0,01$, $PAP_{adult}/\text{Kontrollen}$: $p<0,001$, $PAP_{juvenil}/\text{Kontrollen}$: $p<0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

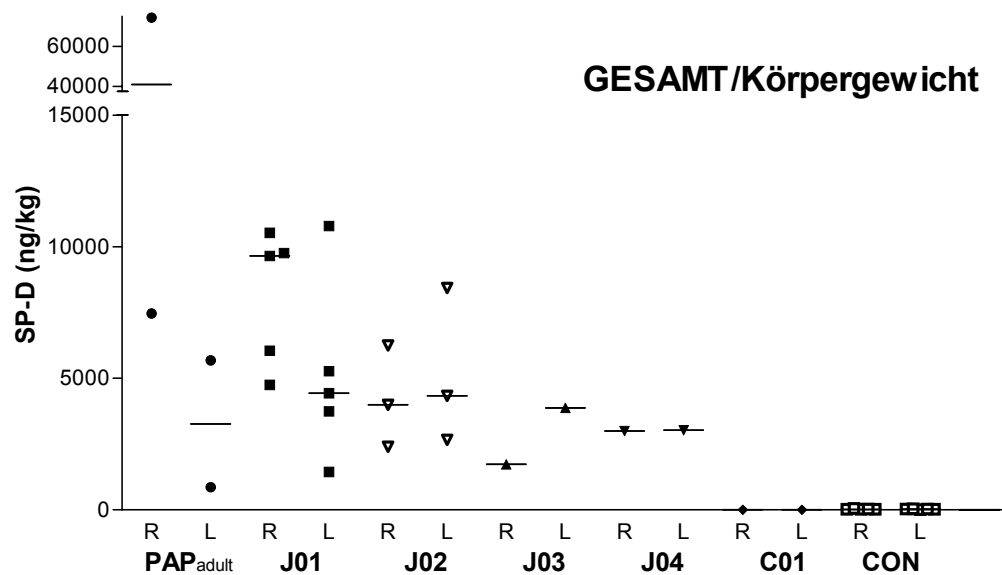


Abb. III.A.1.4.2.2.: SP-D Menge (diagnostische und therapeutische BAL) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der gesamten Spülflüssigkeit einer Lungenseite in ng/kg Körpergewicht. PAP_{adult} entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-D Menge je kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die absolut ausgespülte SP-D Menge war bei adulten PAP Patienten signifikant erhöht. Bezogen auf das Körpergewicht in kg und absolut war die ausgewaschene SP-D Menge der adulten PAP Patienten gegenüber den juvenilen Patienten jedoch nicht erhöht. Die ausgespülte SP-D Menge der adulten und juvenilen PAP Patienten war jedoch gegenüber den Kontrollpatienten sowohl absolut, als auch bezogen auf das Körpergewicht in kg signifikant erhöht. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht signifikant.

Um die Konzentrationsunterschiede besser differenzieren zu können und den Vergleich mit den Kontrollpatienten miteinbeziehen zu können, wurden der Pool und die Halblungenlavagen getrennt dargestellt. Die Poolfraktion war definiert als die 2. bis 4. BAL Portion, die initial zu Beginn jeder Lavage standardisiert mit Portionen von je 1ml/kg Körpergewicht durchgeführt wurde. Somit bestanden zwischen den einzelnen Patienten keine technischen Unterschiede hinsichtlich der BAL Durchführung.

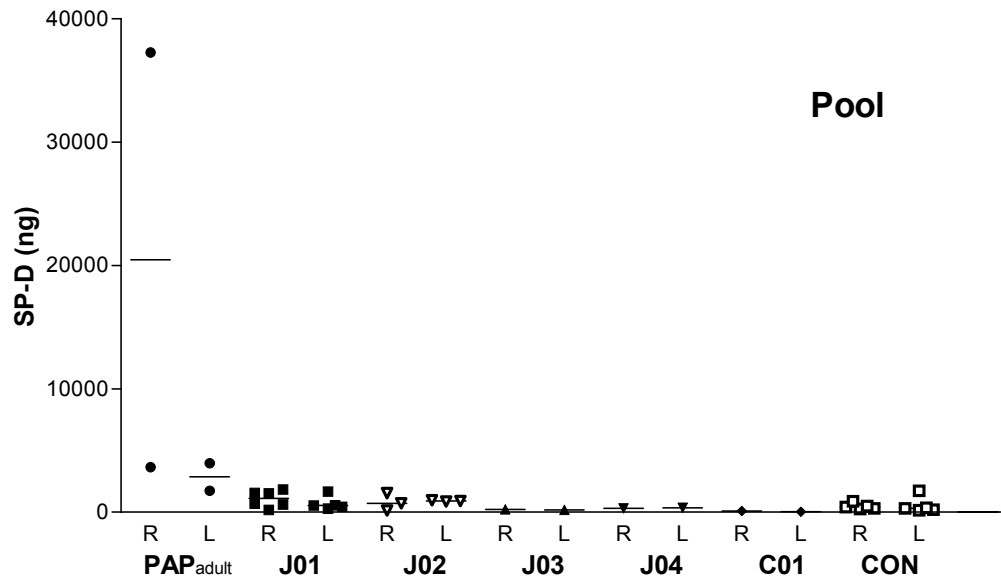


Abb. III.A.1.4.2.3.: SP-D Menge der diagnostische BAL (Pool), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-D Menge des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0031$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p<0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p<0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p>0,05$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

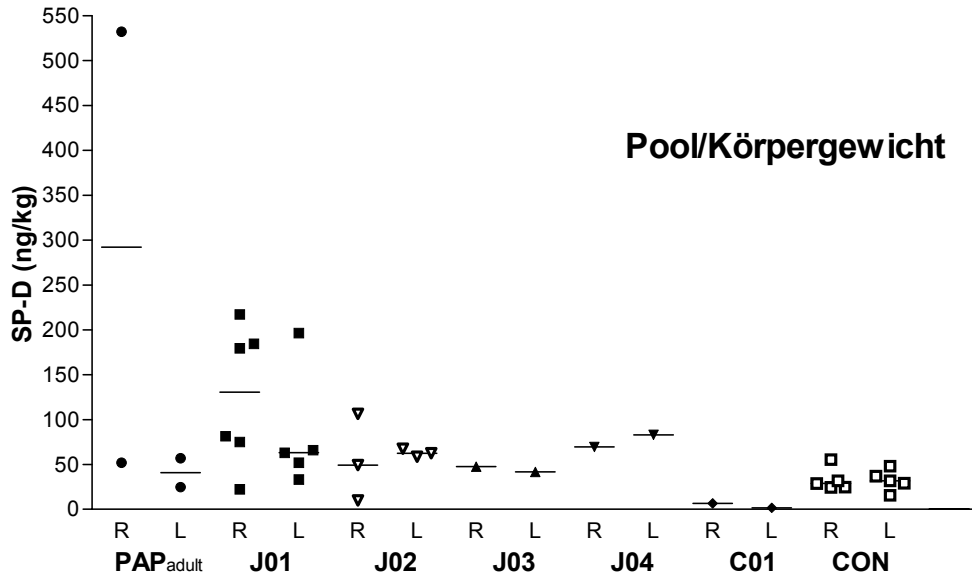


Abb. III.A.1.4.2.4.: SP-D Menge der diagnostische BAL (Pool) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der Spülflüssigkeit eines Pools einer Lungenseite in ng/kg. PAP adult entspricht 4 Pools der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-D Menge pro kg Körpergewicht des Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p=0,0044$ Dunn's post hoc Test PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p>0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p>0,05$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p<0,01$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die ausgespülte, gesamte SP-D Menge des Pools der adulten PAP Patienten ist insgesamt betrachtet gegenüber den juvenilen Patienten signifikant erhöht, auf das

Körpergewicht berechnet ergaben sich jedoch keine Unterschiede. Die adulten PAP Patienten zeigten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Werte, jedoch gab es keine Unterschiede, als die SP-D Konzentrationen auf das Körpergewicht berechnet wurden. Die juvenilen PAP Patienten zeigten nur pro kg Körpergewicht gegenüber den Kontrollen signifikant höhere Werte. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

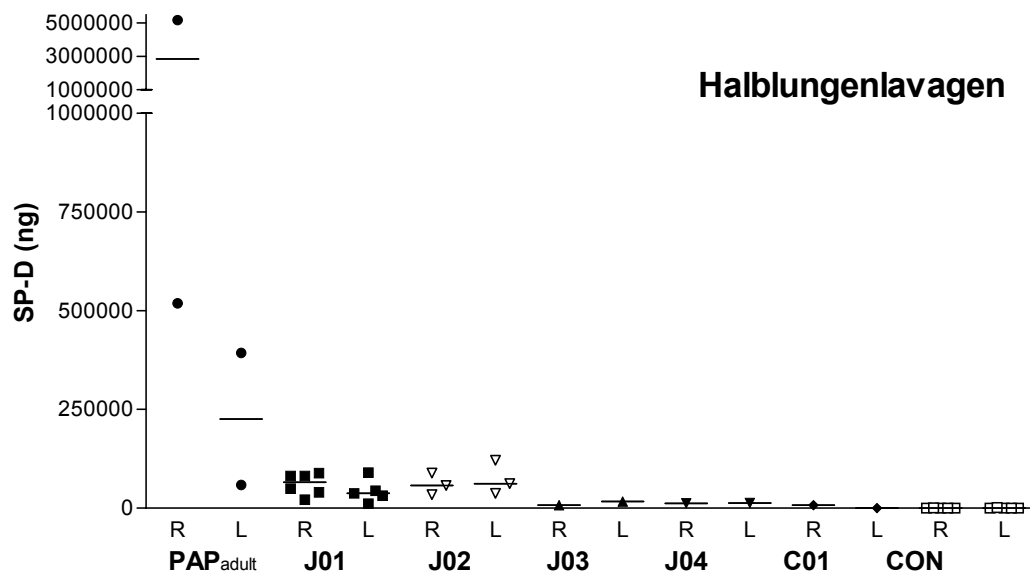


Abb. III.A.1.4.2.5.: SP-D Menge der therapeutischen BAL (Flaschen), die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng. PAP adult entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-D Menge der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,0001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,001$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

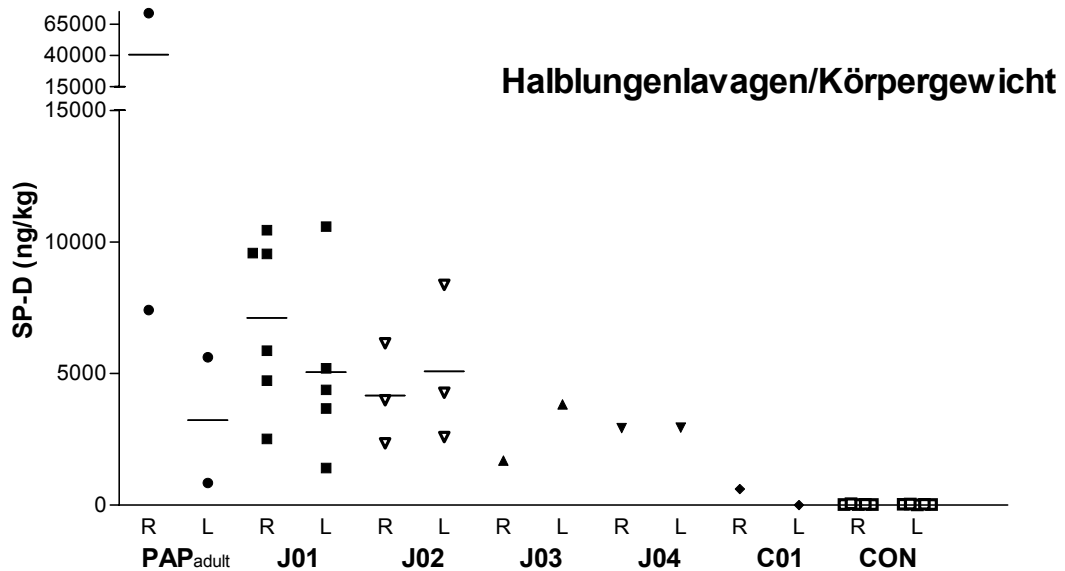


Abb. III.A.1.4.2.6.: SP-D Menge der therapeutischen BAL (Flaschen) bezogen auf das Körpergewicht in kg, die mittels BAL aus der rechten (R) bzw. linken (L) Lungenseite ausgewaschen wurde. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge der Spülflüssigkeit einer Halblungenlavage einer Lungenseite in ng/kg. PAP_{adult} entspricht 4 Halblungenlavagen der Patienten A01-A03. CON entspricht der SP-D Menge pro kg Körpergewicht der Pools der Kontrollpatienten C01-C10. Mediane sind eingezeichnet. Kruskal-Wallis Test: $p < 0,001$, Dunn's post hoc Test: PAP_{adult}/PAP_{juvenil}: $p > 0,05$, PAP_{adult}/Kontrollen: $p < 0,01$, PAP_{juvenil}/Kontrollen: $p < 0,001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Sowohl die absolut ausgewaschene SP-D Menge, als auch die SP-A Menge, berechnet auf das Körpergewicht war zwischen juvenilen PAP Patienten und adulten PAP Patienten nicht signifikant unterschiedlich. Juvenile und adulte Patienten zeigten in beiden Darstellungsweisen signifikant erhöhte Werte gegenüber den Kontrollpatienten. Die rechte und linke Lungenseite der Patienten unterschieden sich nicht signifikant.

Zusammenfassung Gesamtgehaltsanalyse SP-D

➤ Konzentration:

- Zwischen den juvenilen und adulten PAP Patienten zeigten sich keine signifikante Unterschiede in der SP-D Konzentration der Lavage. Bezogen auf das Körpergewicht zeigten sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch waren die juvenilen Werte erhöht.
- Die Konzentration absolut, als auch die Konzentration auf das Körpergewicht bezogen, war bei allen PAP Patienten ebenso hoch wie bei den Kontrollpatienten.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavagen zeigte zwischen den einzelnen Patientengruppen keine Unterschiede.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

➤ Gesamtmenge:

- Die absolut ausgespülte SP-D Menge war bei adulten PAP Patienten signifikant erhöht. Bezogen auf das Körpergewicht in kg und absolut war die ausgewaschene SP-D Menge der adulten PAP Patienten gegenüber den juvenilen Patienten jedoch nicht erhöht.
- Bei adulten und juvenilen PAP Patienten wurde gegenüber den Kontrollpatienten signifikant mehr SP-D aus der Lunge gespült.
- Die getrennte Darstellung der Pool Fraktion und der Halblungenlavage zeigte für die Halblungenlavagen das gleiche Ergebnis. Betrachtet man allerdings den Pool, haben die adulten Patienten absolut mehr SP-D in der Lunge, bezogen auf das Körpergewicht gab es keine Unterschiede. Bei den juvenilen Patienten gab es nur bezogen auf das Körpergewicht signifikant höhere Werte als die Kontrollen.
- Rechte und linke Lungenseite unterscheiden sich nicht signifikant.

III.A.2. Auswaschkinetik

III.A.2.1. Protein

III.A.2.1.1. Konzentration

III.A.2.1.1.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen der juvenilen Patienten untersucht, um die Auswaschkinetik, unabhängig von den Auswaschvolumina, beurteilen zu können. Es wurde die Proteinkonzentrationsbestimmungsmethode nach Bradford verwendet.

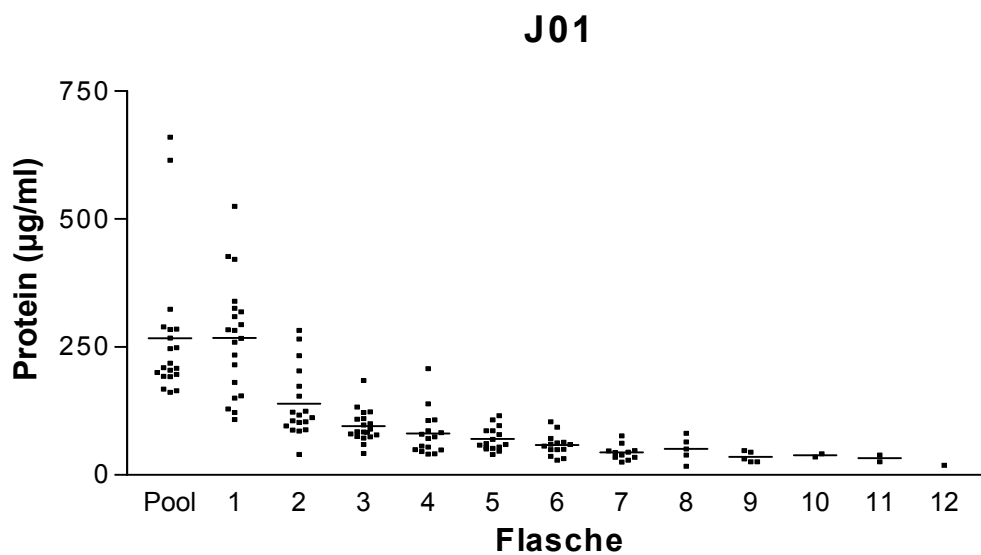


Abb. III.A.2.1.1.1.1.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 20 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in $\mu\text{g/ml}$ des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang

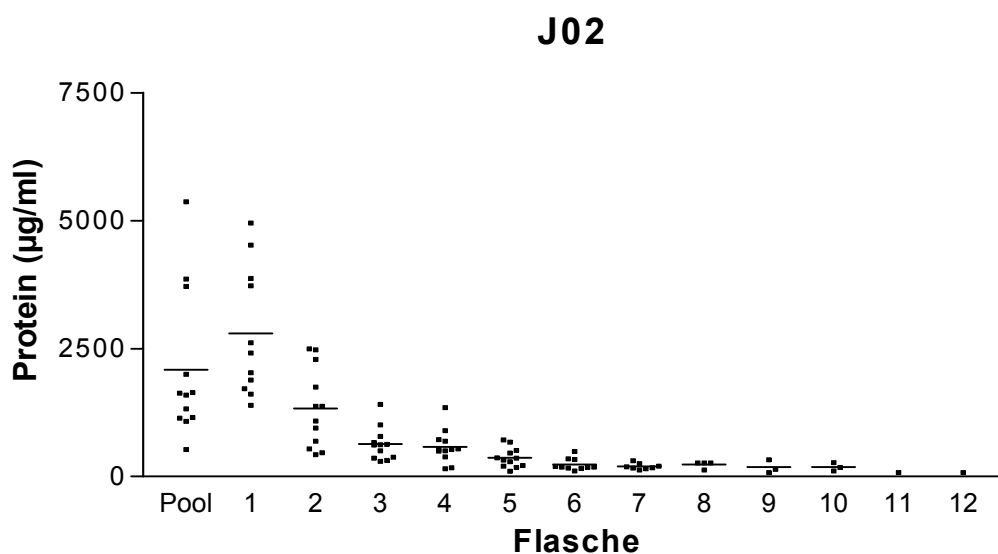


Abb. III.A.2.1.1.1.2.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 12 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in $\mu\text{g/ml}$ des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

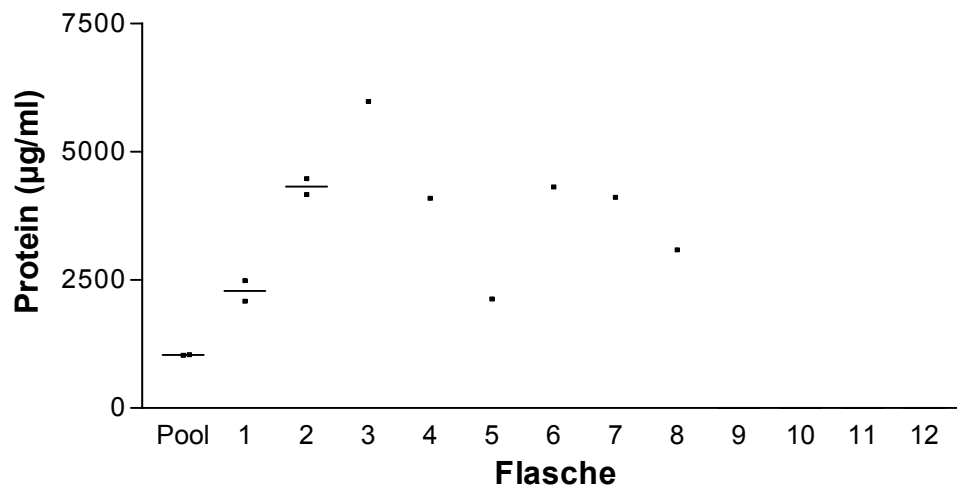
J03

Abb. III.A.2.1.1.1.3.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

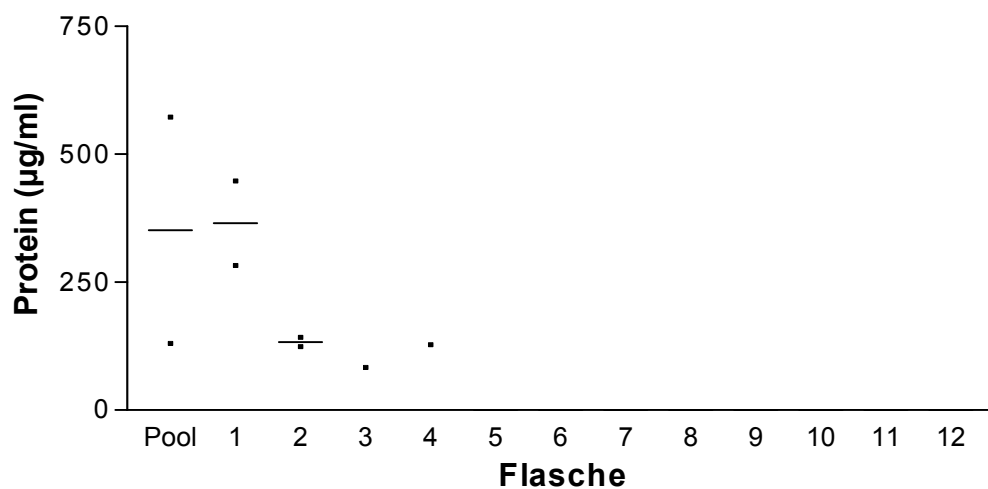
J04

Abb. III.A.2.1.1.1.4.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für die Patienten J01, J02 und J04 lässt sich eine hyperbole Auswaschkinetik erkennen. Bei dem Patienten J03 ist keine einheitliche Auswaschkinetik erkennbar. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Pool Fraktionen eine geringere Konzentration aufweisen als die folgende 1. Flasche. Dies liegt daran, dass die Pool Fraktion nur zentrifugiert zur Verfügung stand, was einen Konzentrationsverlust von ca. 30 %

bedingt (siehe Material und Methoden). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der rechten und linken Lungenseite.

III.A.2.1.1.2. Adulte Patienten

A 0 4

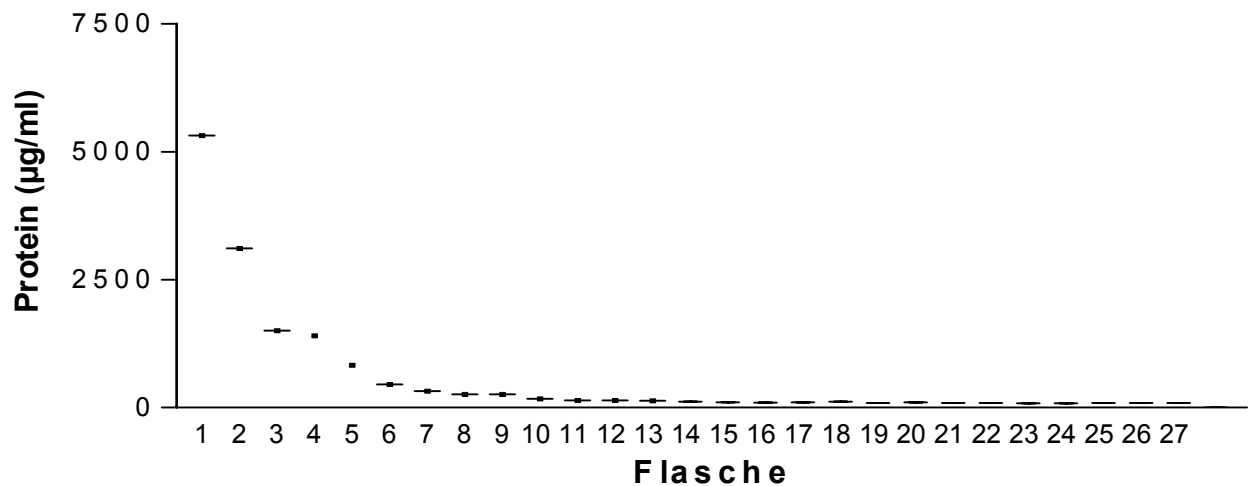


Abb. III.A.2.1.1.2.1.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) in µg/ml des Patienten A04. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

A 0 5

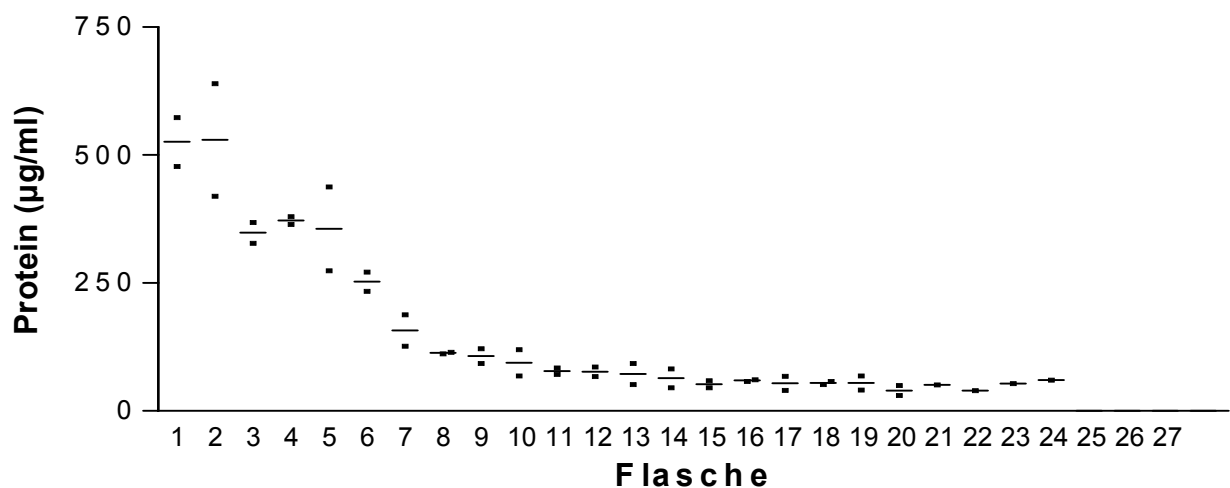


Abb. III.A.2.1.1.2.2.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) in µg/ml des Patienten A05. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

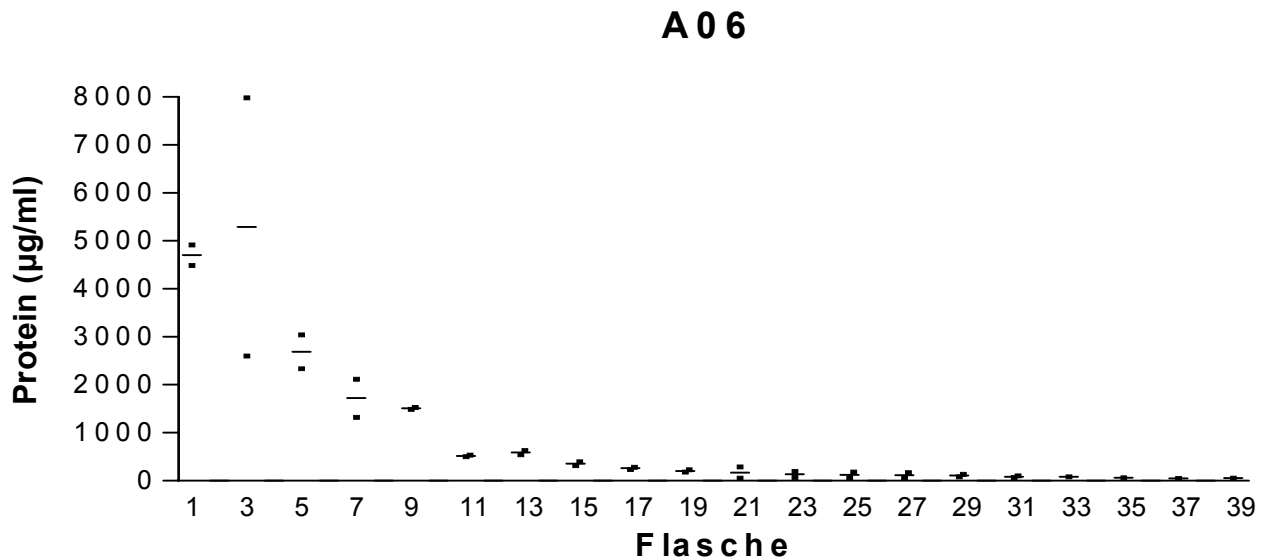


Abb. III.A.2.1.1.2.3.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Nur jede 2. Spülflasche war vorhanden. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) in µg/ml des Patienten A06. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei allen 5 adulten Halblungenlavagen zeigte sich ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik, welche sich aber gleichmäßiger darstellte als bei den juvenilen Patienten. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht differentiell.

III.A.2.1.1.3. Cholesterolpneumonitis

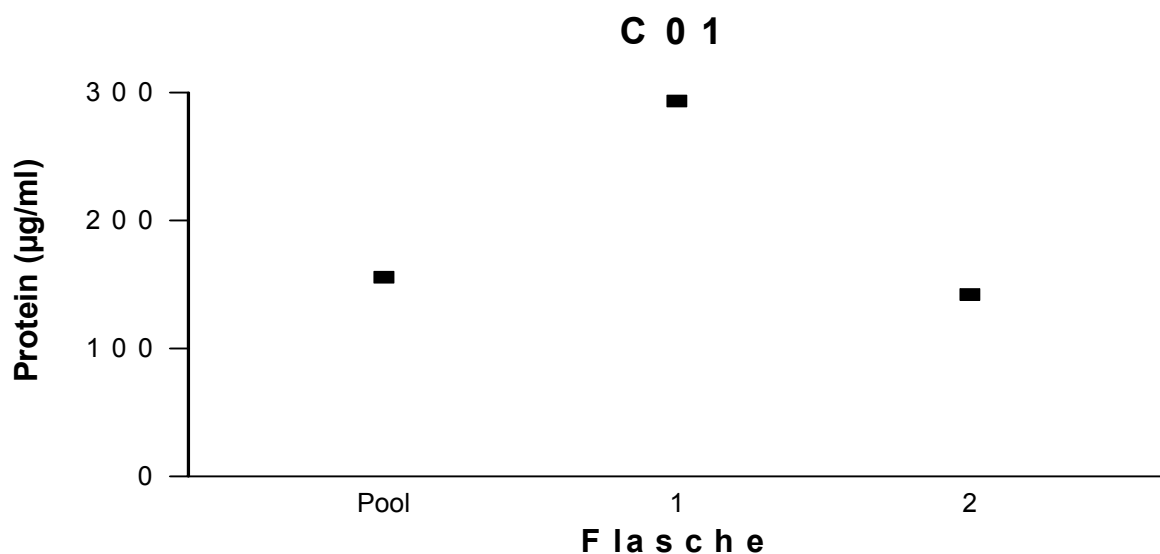


Abb. III.A.2.1.1.3.1.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Der Patient mit Cholesterolpneumonitis dient als Kontrollpatient, da er als einziger Patient ohne die endgültige Diagnose pulmonale Alveolarproteinose über mehrere Spülflaschen lavagiert worden ist. Die Auswaschkinetik zeigt den gleichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten und die Konzentration des Pools liegt unter der Konzentration der 1. Flasche. Dies kann zum Teil damit erklärt werden, dass der Pool vor der Messung zentrifugiert wurde. Die Konzentration der 2. Flasche liegt unter der Konzentration der 1. Flasche, was der Kinetik der PAP Patienten entspricht.

III.A.2.1.2. Gesamtmenge je 500ml Portion

III.A.2.1.2.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden sollte die Effektivität der Lungenspülung anhand der Gesamtmenge an Protein gezeigt werden, welche in den einzelnen Flaschen und der Pool Fraktion vorhanden war. Die Werte ergaben sich aus der Multiplikation der Konzentrationen der einzelnen Portion mit den Volumina.

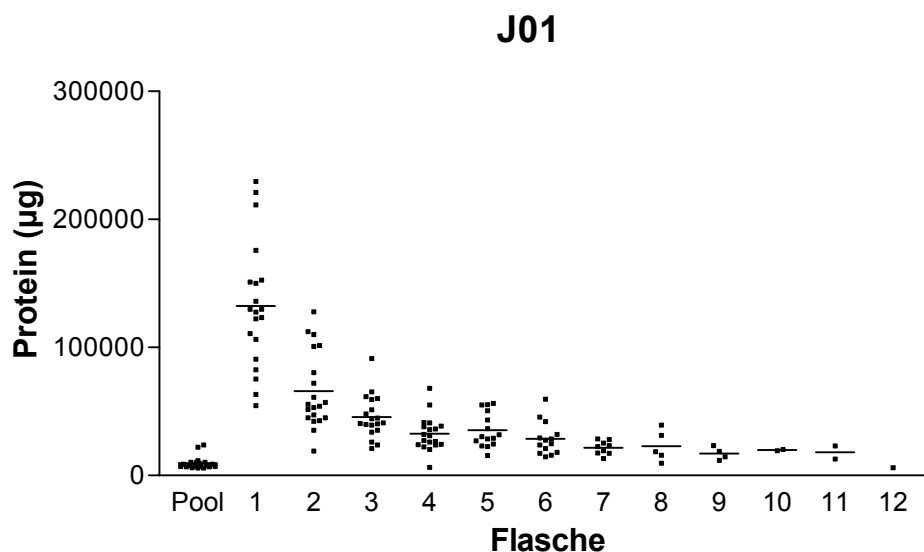


Abb. III.A.2.1.2.1.1.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 20 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

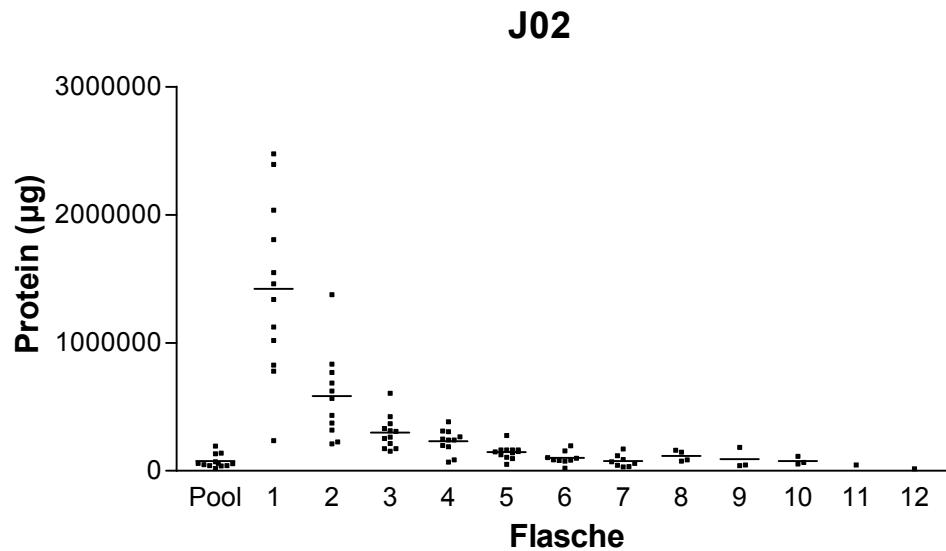


Abb. III.A.2.1.2.1.2.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 12 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in μg des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

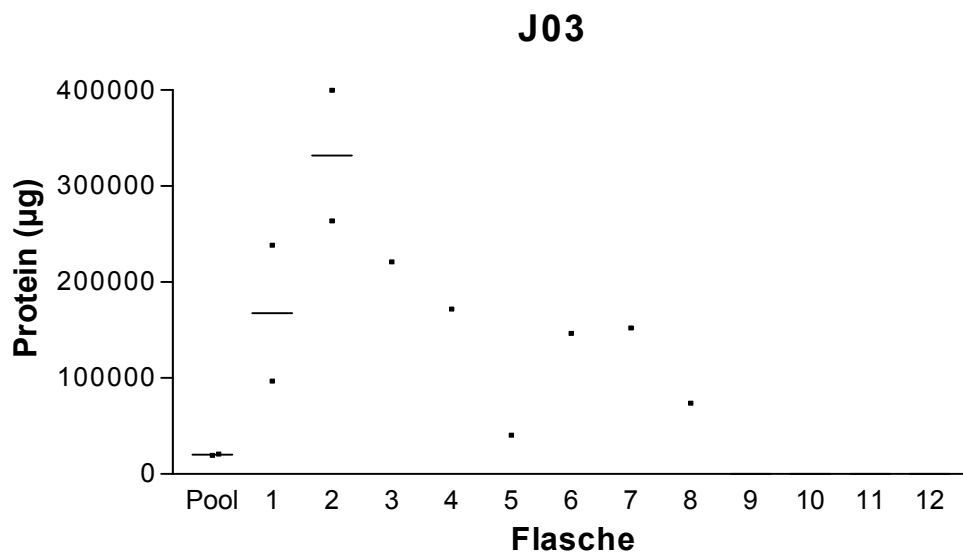


Abb. III.A.2.1.2.1.3.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in μg des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

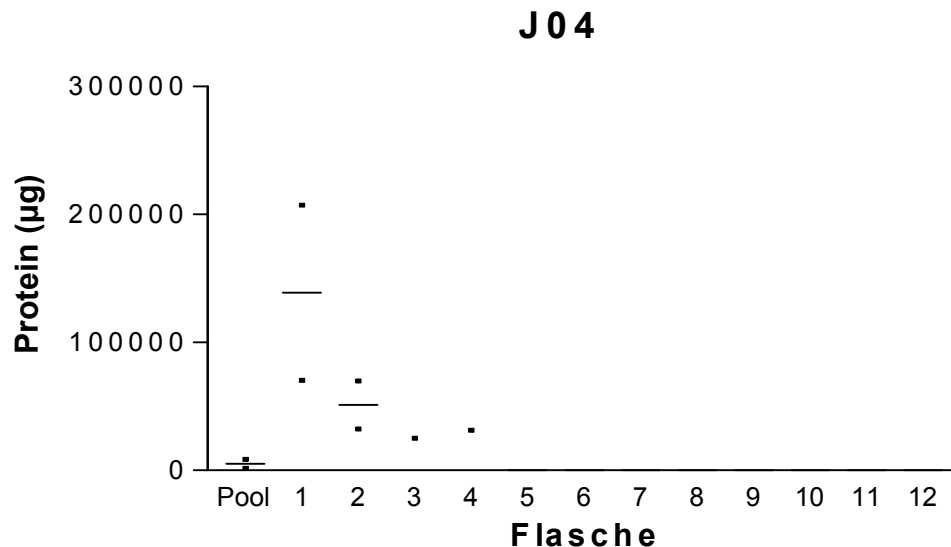


Abb. III.A.2.1.2.1.4.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamtmenge an Protein in den einzelnen Flaschen über die Dauer der Lavage abnimmt. Die Pool Fraktion zeigt in sämtlichen Darstellungen die geringste Menge an Protein, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pool Fraktion nur zentrifugiert gemessen wurde und der Pool zudem nur einen Bruchteil des Volumens der Flaschen hat.

III.A.2.1.2.2. Adulte Patienten

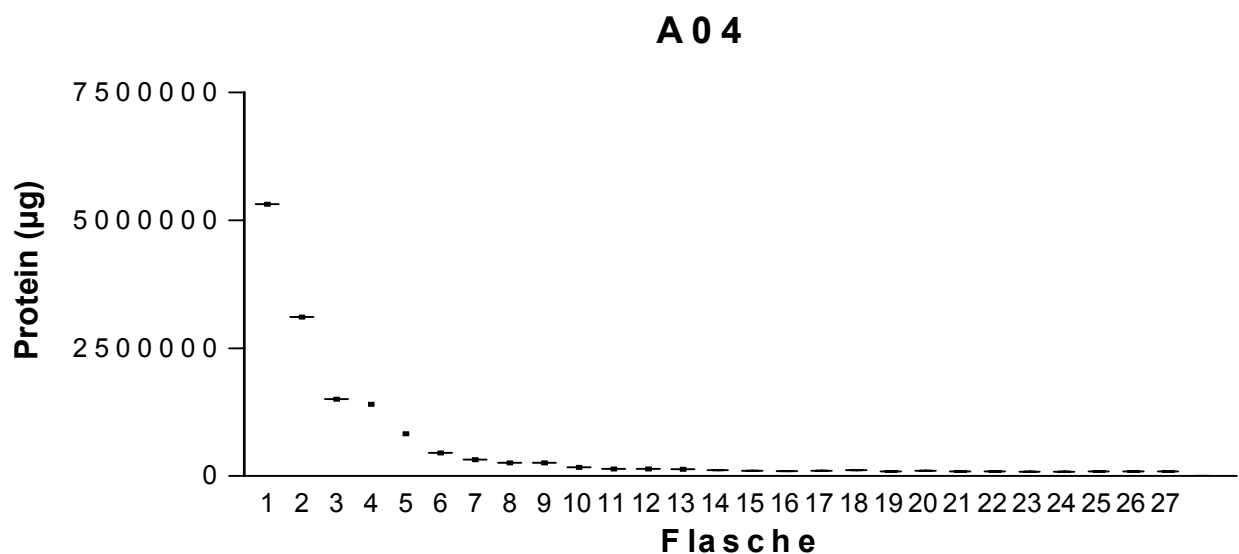


Abb. III.A.2.1.2.2.1.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) einer Lungenseite in µg des Patienten A04. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

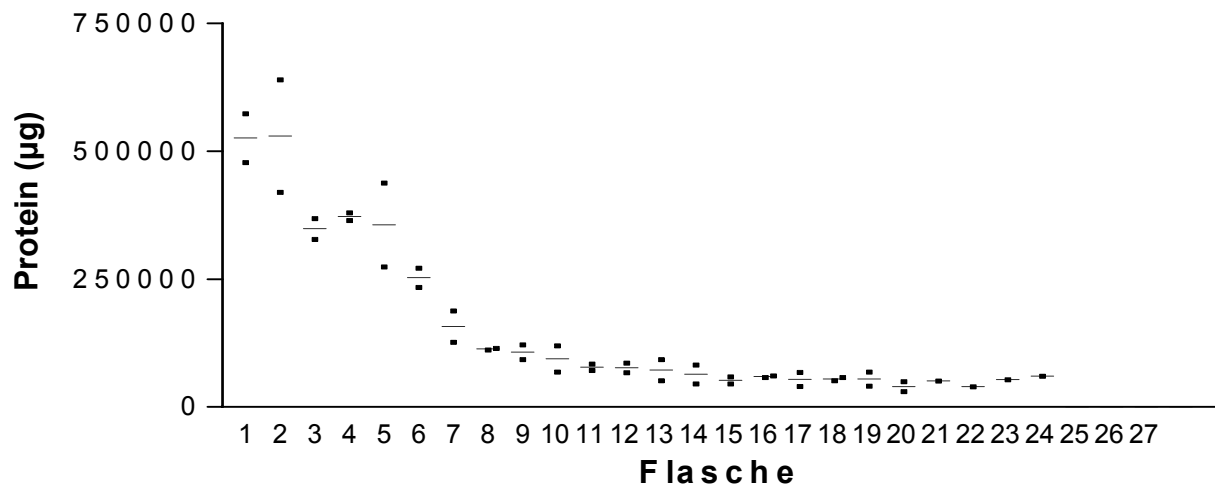
A 0 5

Abb. III.A.2.1.2.2.2.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) einer Lungenseite in µg des Patienten A05. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

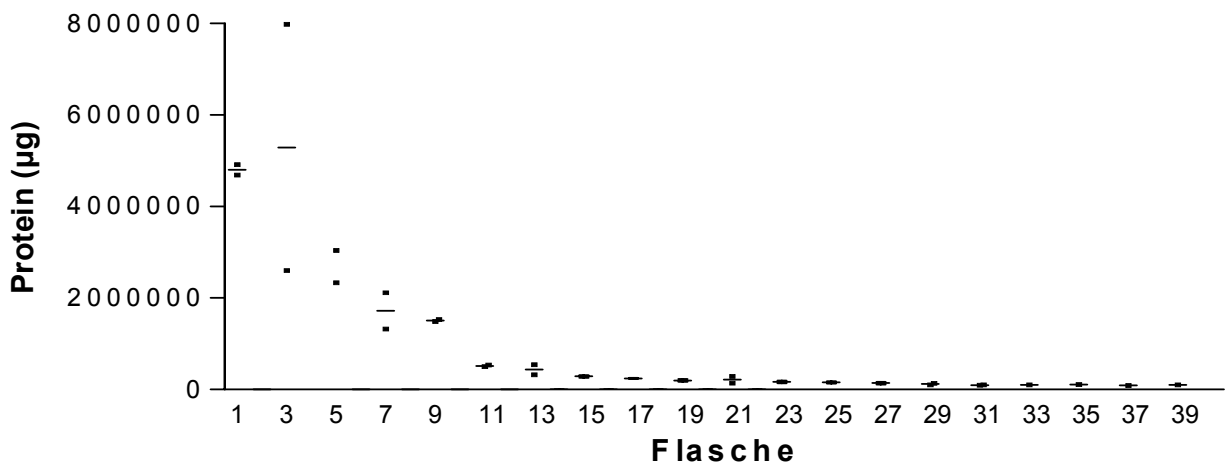
A 0 6

Abb. III.A.2.1.2.2.3.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) einer Lungenseite in µg des Patienten A06. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei allen 5 adulten Halblungenlavagen zeigte sich ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik, welche sich aber gleichmäßiger darstellte als bei den juvenilen Patienten. Nach einem Drittel der Lavage änderte sich die Gesamtmenge an Protein in den Flaschen nicht mehr signifikant. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht.

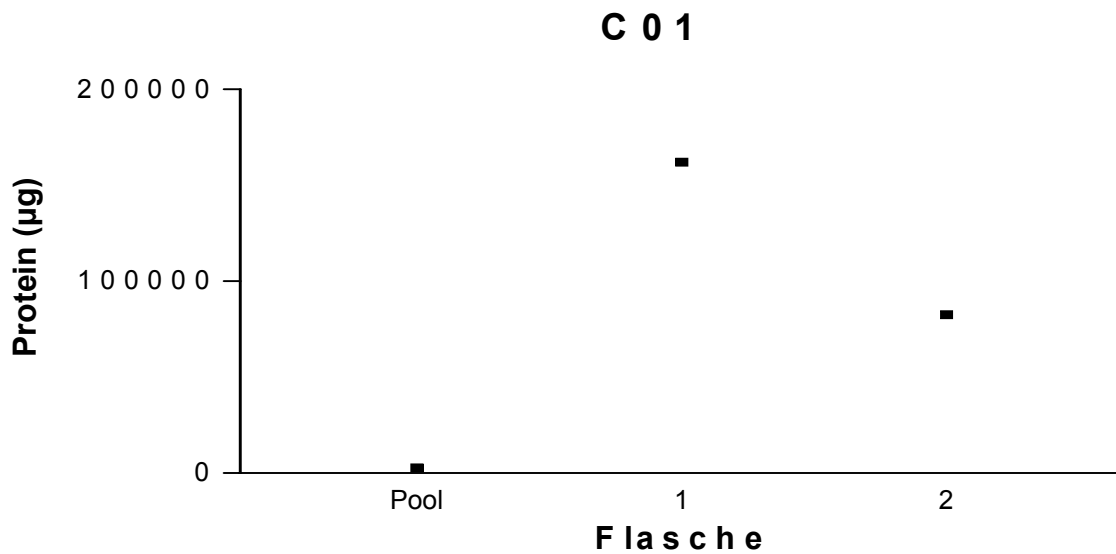
III.A.2.1.2.3. Cholesterolpneumonitis

Abb. III.A.2.1.2.3.1.: Darstellung der Gesamtproteinmengen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die Auswaschkinetik zeigt den gleichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten, die Gesamtproteinmenge des Pools liegt unter der Gesamtmenge der 1. Flasche, da er vor der Messung zentrifugiert wurde und das Volumen geringer war. Die Proteingesamtmenge der 2. Flasche liegt unter der Menge der 1. Flasche, was der Kinetik der PAP Patienten entspricht.

III.A.2.1.3. Protein % Gesamt

III.A.2.1.3.1. Juvenile Patienten

Der Restproteingehalt, welcher noch in der Lunge verblieben ist nach der jeweiligen Spülportion, wurde als nächstes graphisch dargestellt.

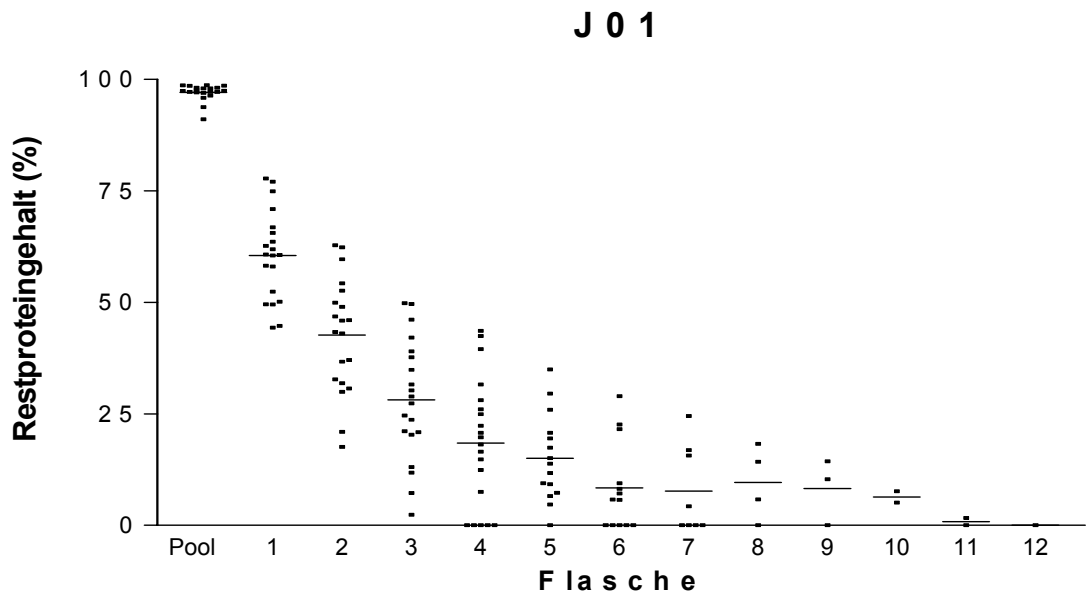


Abb. III.A.2.1.3.1.1.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 20 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

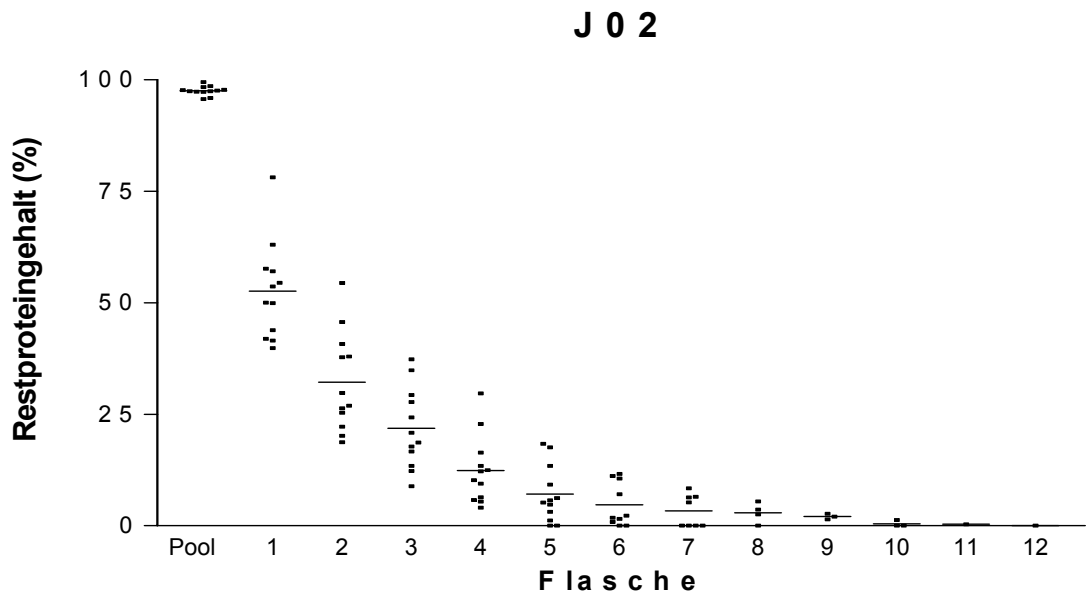


Abb. III.A.2.1.3.1.2.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 12 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

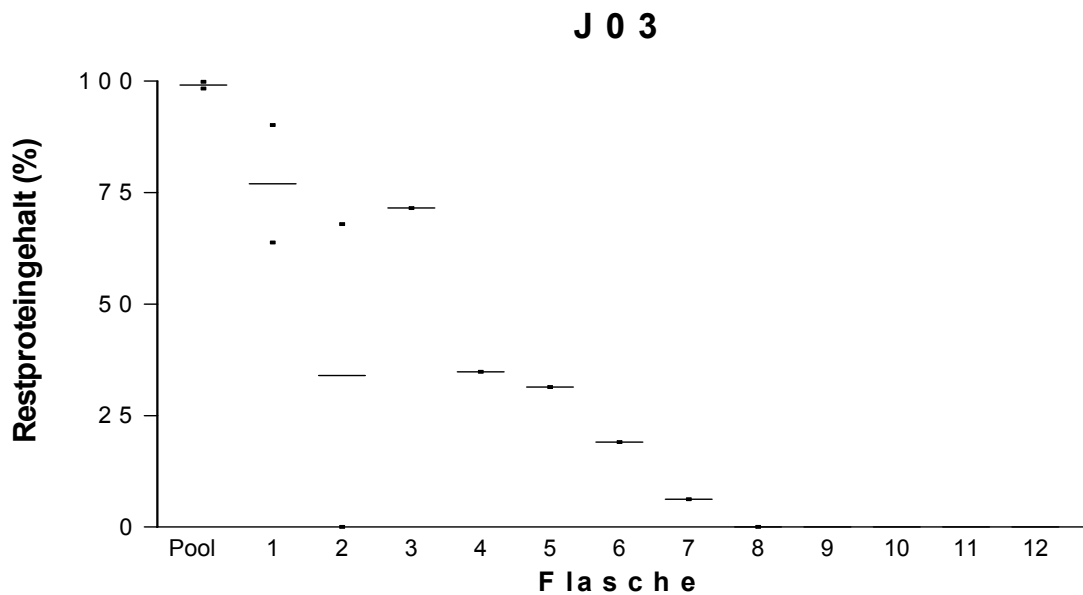


Abb. III.A.2.1.3.1.3.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

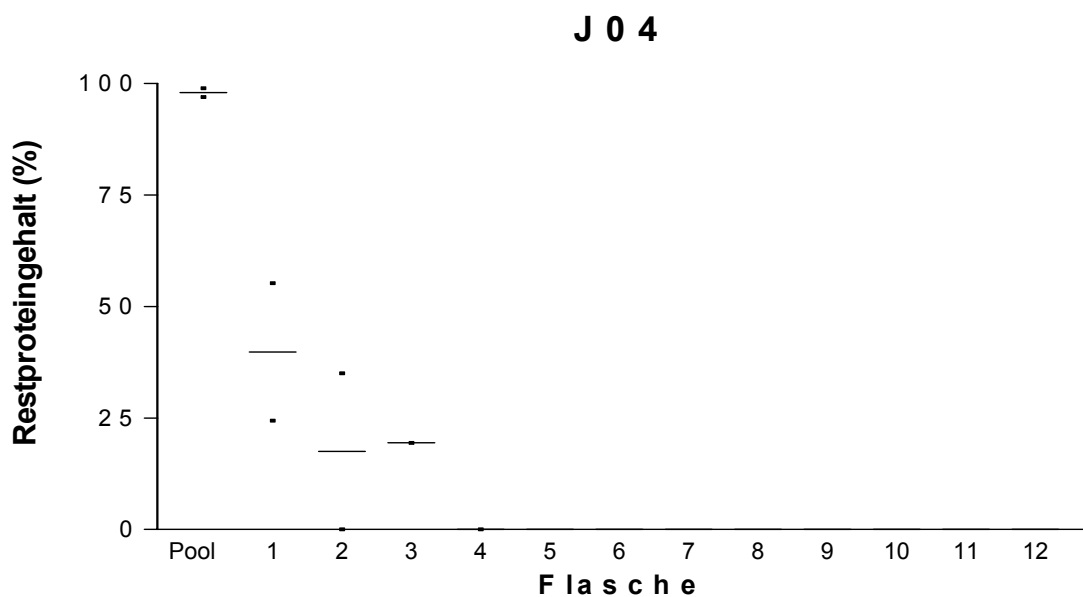


Abb. III.A.2.1.3.1.4.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass der Restproteingehalt in % zu Beginn der Lavage stärker abnimmt als zum Ende der Lavage hin. Insgesamt jedoch zeigt sich bei allen Patienten eine gleichmäßige hyperbole Auswaschkinetik, wie bei der Darstellung der Konzentration. Die Pool Fraktion variiert in sämtlichen Darstellungen nur gering von

100% was auf das geringe Volumen dieser Fraktion zurückzuführen ist. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lungenseiten.

III.A.2.1.3.2. Adulte Patienten

A 0 4

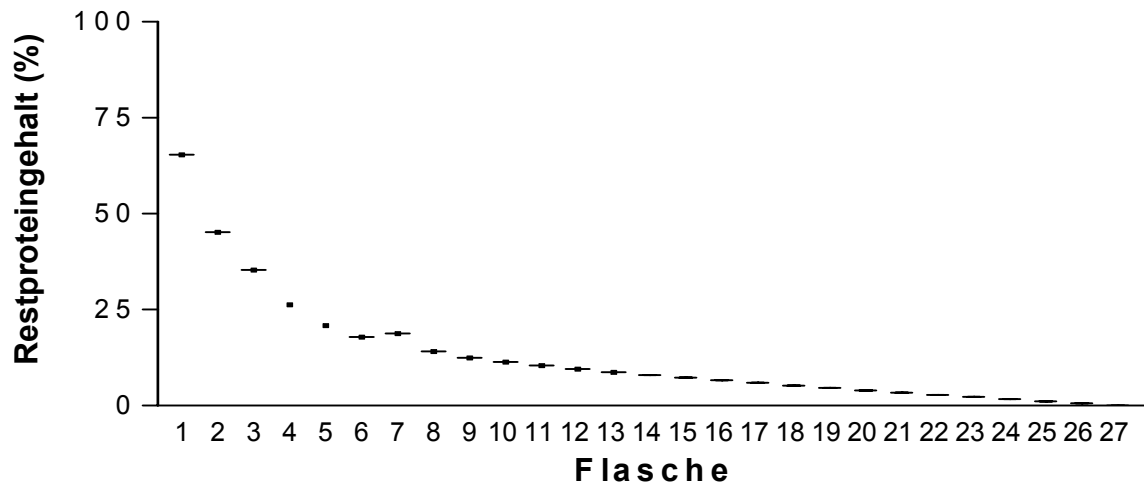


Abb. III.A.2.1.3.2.1.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

A 0 5

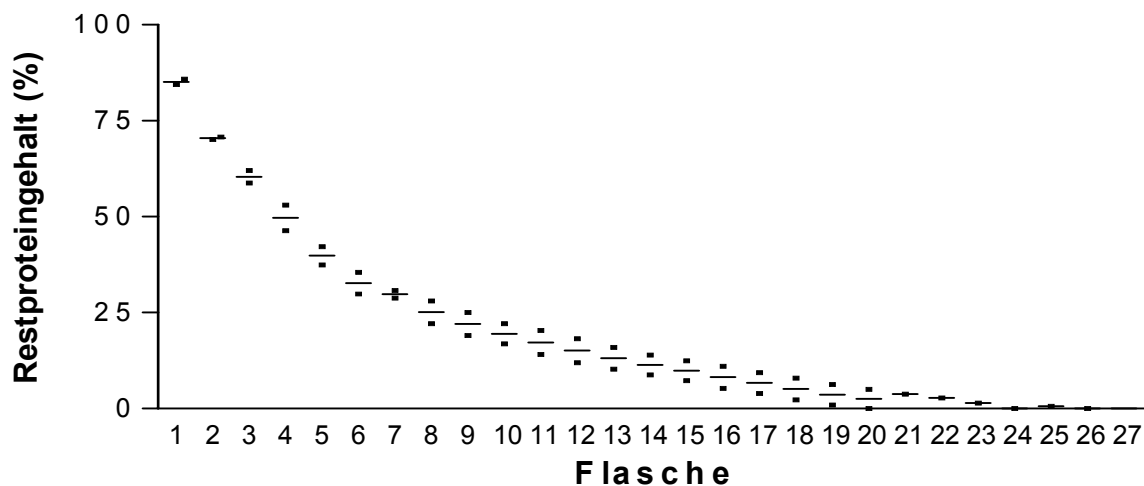


Abb. III.A.2.1.3.2.2.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

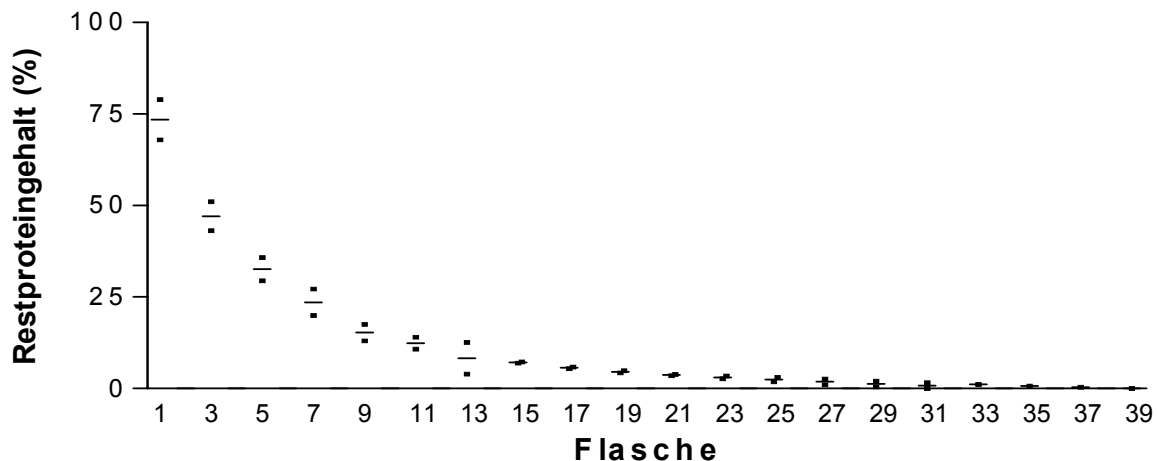
A 0 6

Abb. III.A.2.1.3.2.3.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei den untersuchten Lavagen der adulten Patienten zeigte sich ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik. Zu Beginn der Lavage sank der Restproteingehalt stärker ab als im weiteren Verlauf der Lavage. Die rechte und linke Lungenseite unterschieden sich nicht differentiell.

III.A.2.1.3.3. Cholesterolpneumonitis

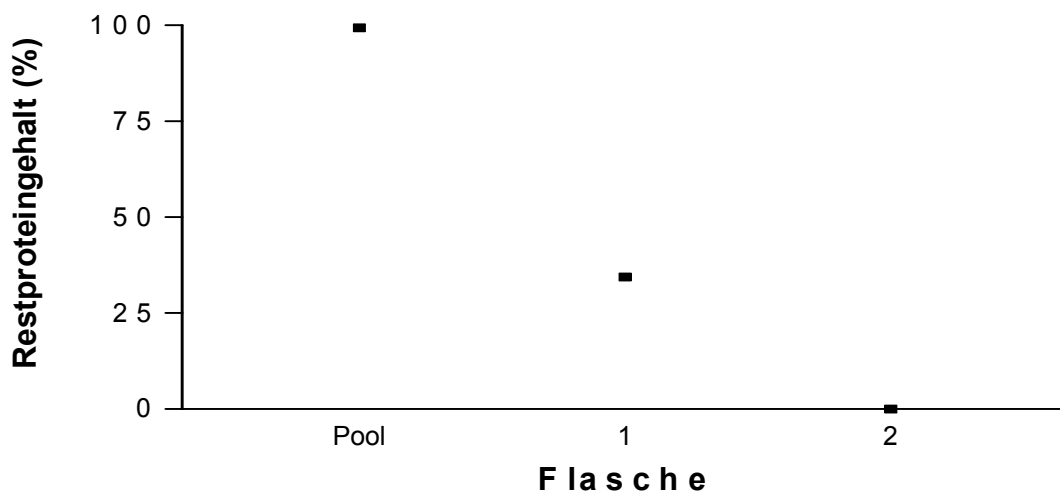
C 0 1

Abb. III.A.2.1.3.3.1.: Darstellung des Restproteingehaltes, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für den Patienten mit Cholesterolpneumonitis war die gleiche Auswaschcharakteristik festzustellen wie bei den adulten und juvenilen PAP Patienten.

III.A.2.2. Phospholipid

III.A.2.2.1. Konzentration

III.A.2.2.1.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden wurden die Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen der juvenilen Patienten untersucht, um die Auswaschkinetik unabhängig von den Auswaschvolumina beurteilen zu können.

J01

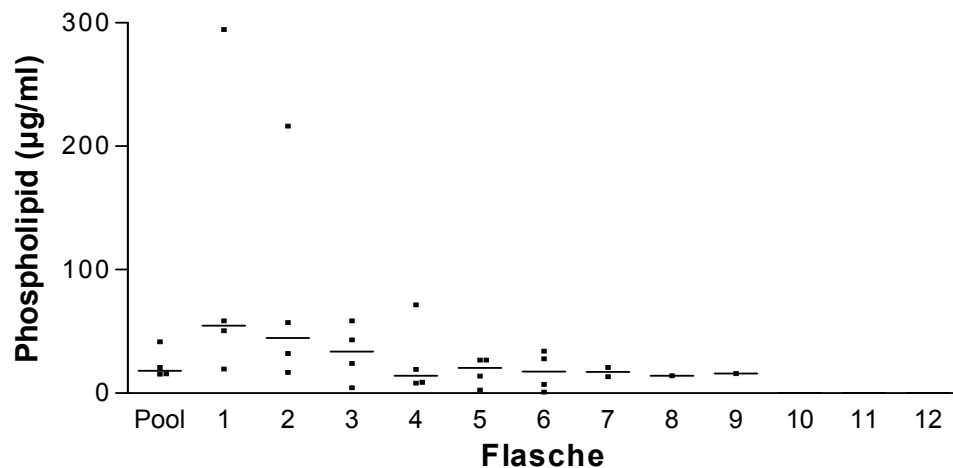


Abb. III.A.2.2.1.1.1.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 4 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang

J02

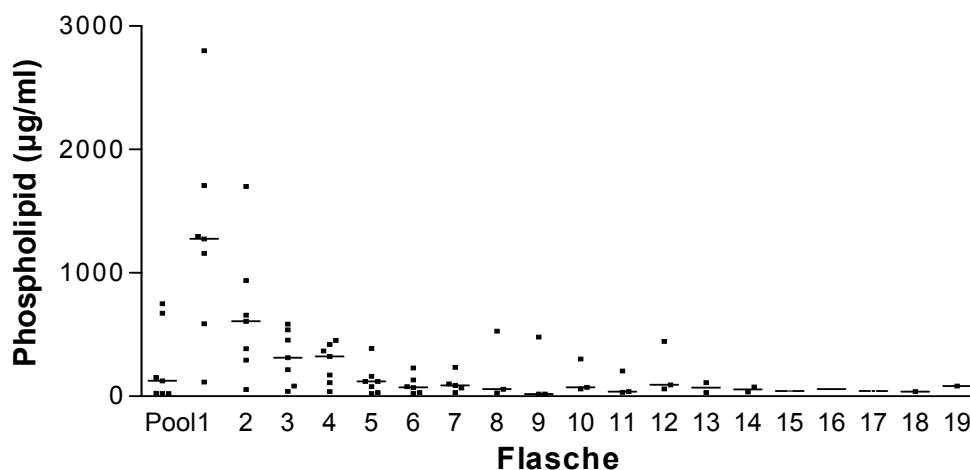


Abb. III.A.2.2.1.1.2.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 7 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

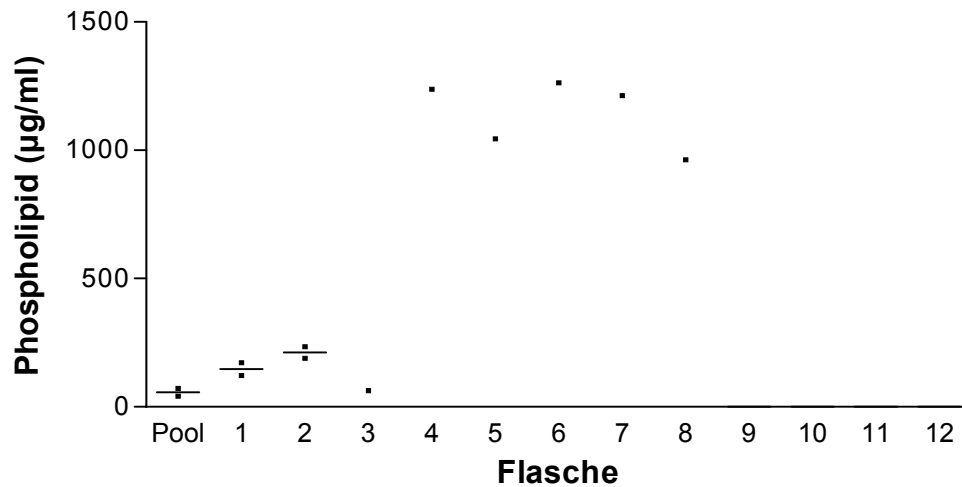
J03

Abb. III.A.2.2.1.1.3.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

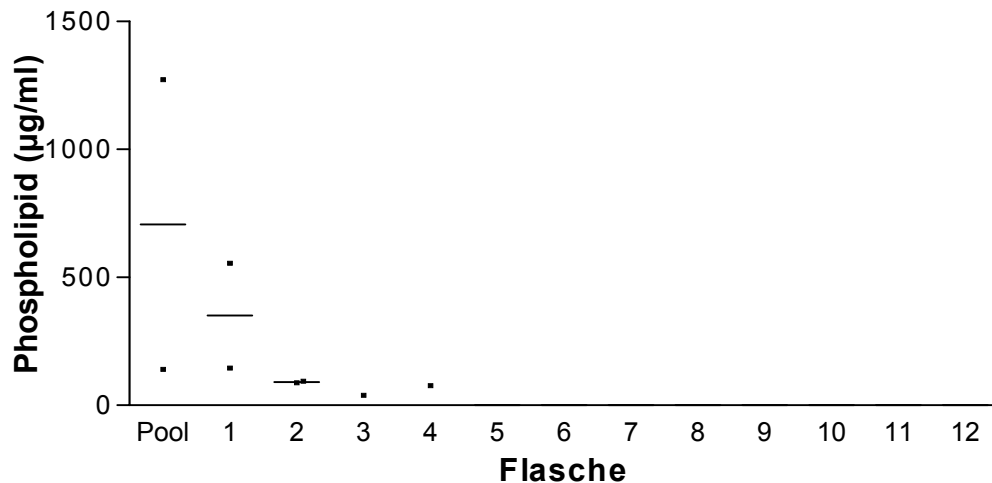
J04

Abb. III.A.2.2.1.1.4.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für die Patienten J01, J02 und J04 lässt sich eine hyperbole Auswaschkinetik erkennen. Bei dem Patienten J03 ist keine einheitliche Auswaschkinetik erkennbar. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Pool Fraktionen eine geringere Konzentration aufweisen als die folgende 1. Flasche. Dies liegt daran, dass die Pool Fraktion nur zentrifugiert zur Verfügung stand, was einen Konzentrationsverlust von ca. 30 %

bedingt (siehe Material und Methoden). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der rechten und linken Lungenseite.

III.A.2.2.1.2. Adulte Patienten

A 0 4

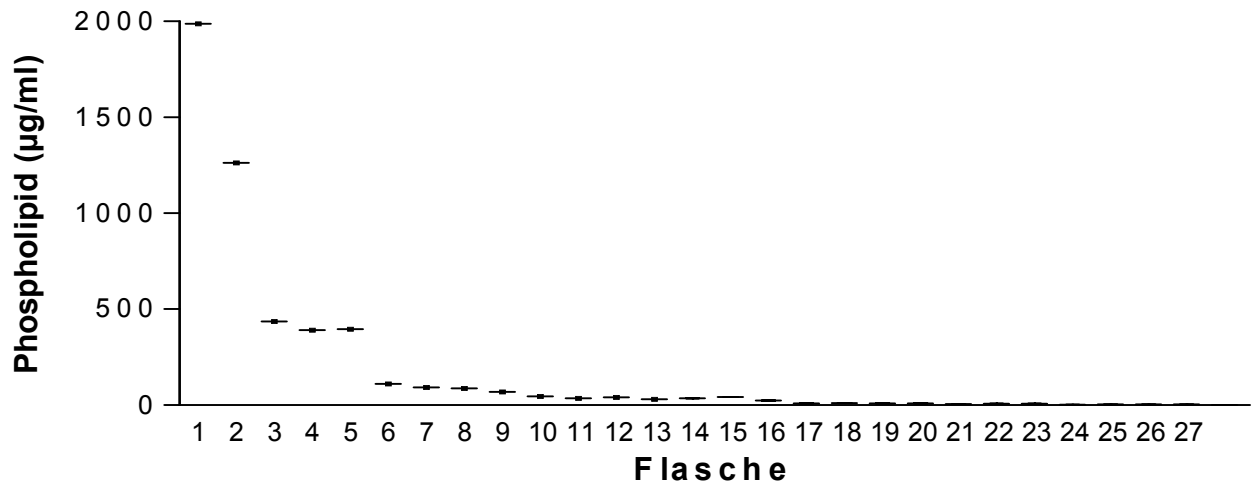


Abb. III.A.2.2.1.2.1.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) in µg/ml des Patienten A04. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die adulte Halblungenlavage zeigte ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik, welche sich aber gleichmäßiger darstellte als bei den juvenilen Patienten.

III.A.2.2.1.3. Cholesterolpneumonitis

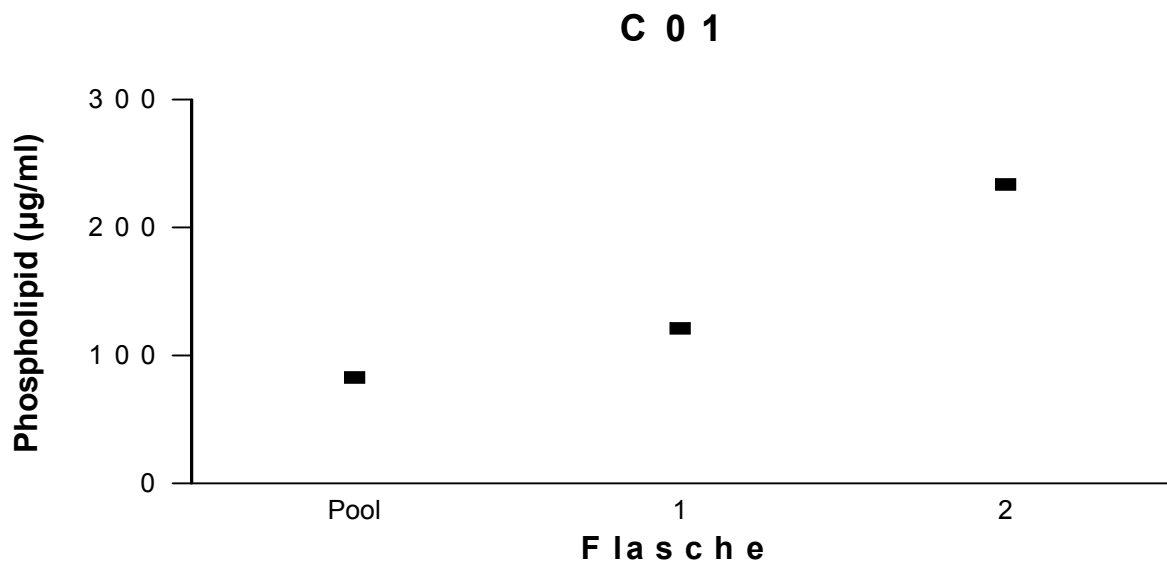


Abb. III.A.2.2.1.3.1.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in µg/ml des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Der Patient mit Cholesterolpneumonitis dient als Kontrollpatient, da er als einziger Patient ohne die endgültige Diagnose pulmonale Alveolarproteinose über mehrere Spülflaschen lavagiert worden ist. Die Auswaschkinetik zeigt einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten und die Konzentrationen der einzelnen Spülportionen steigen an. Die höchste Phospholipidkonzentration befindet sich in der 2. Spülportion.

III.A.2.2.2. Gesamtmenge je 500ml Portion

III.A.2.2.2.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden sollte die Effektivität der Lungenspülung anhand der Gesamtmenge an Phospholipid gezeigt werden, welche in den einzelnen Flaschen und der Pool Fraktion vorhanden war. Die Werte ergaben sich aus der Multiplikation der Konzentrationen der einzelnen Portion mit den Volumina.

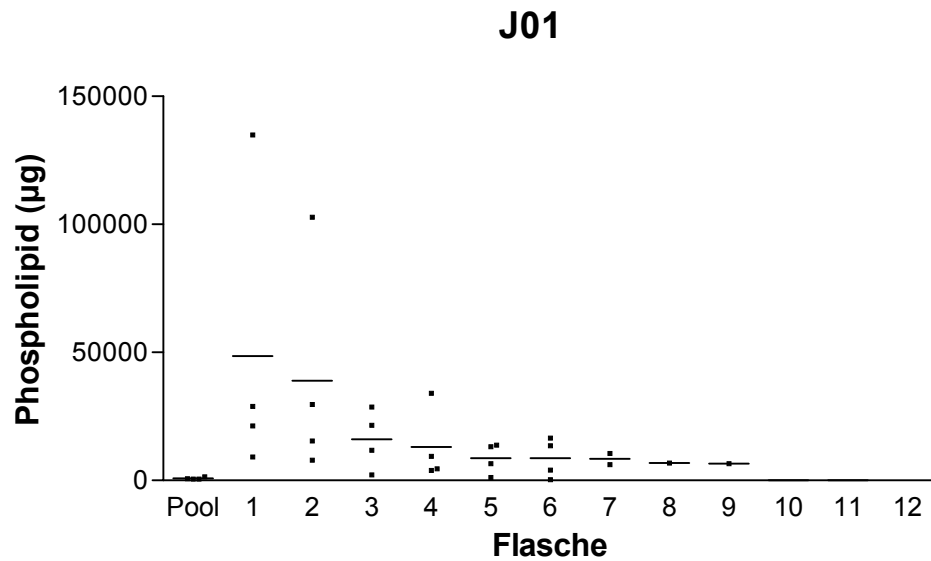


Abb. III.A.2.2.2.1.1.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von 4 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in μg des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

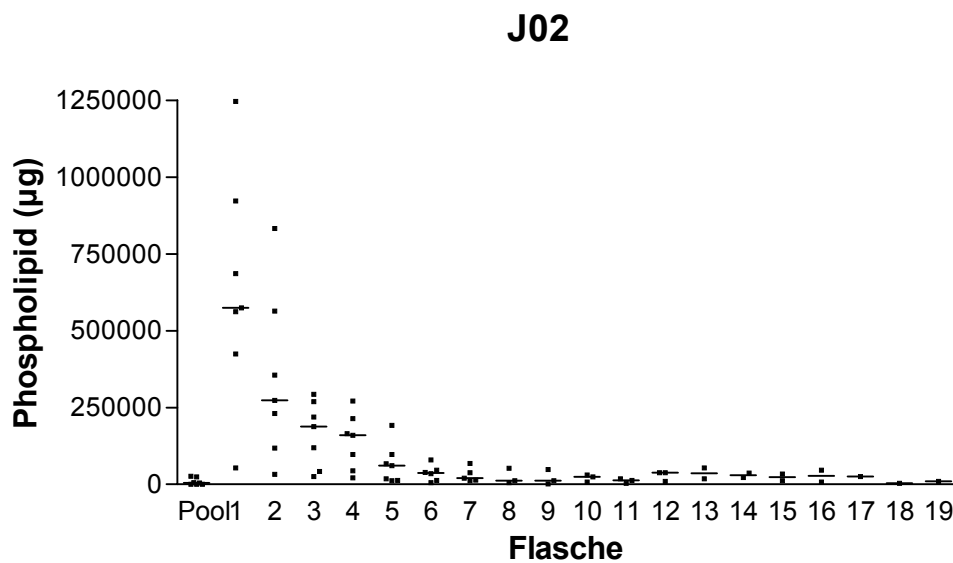


Abb. III.A.2.2.2.1.2.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von 7 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in μg des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

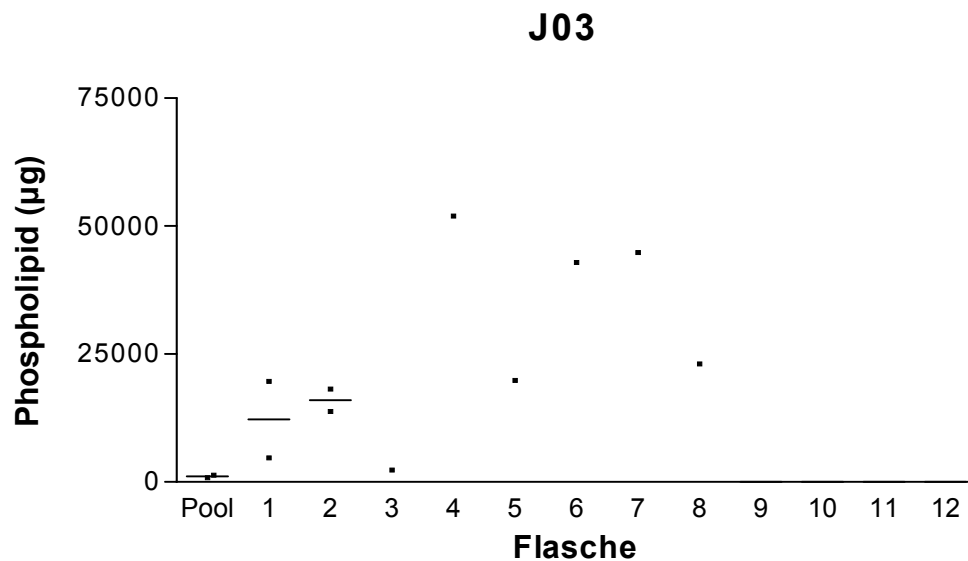


Abb. III.A.2.2.1.3.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

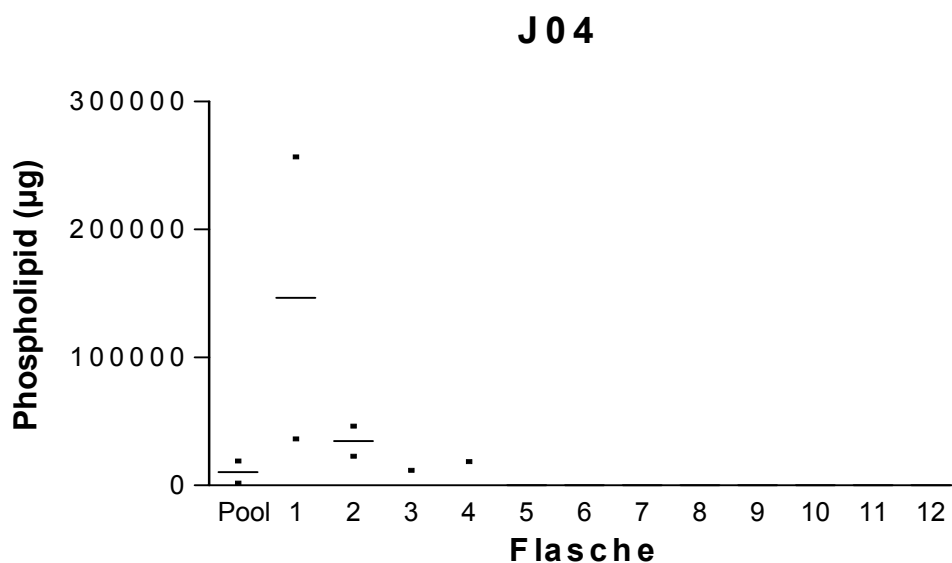


Abb. III.A.2.2.1.4.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamtmenge an Phospholipid in den einzelnen Flaschen über die Dauer der Lavage abnimmt. Nur der Patient J03 zeigt kein einheitliches Auswaschmuster. Die Pool Fraktion zeigt in sämtlichen Darstellungen die geringste Menge an Phospholipid, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pool

Fraktion nur zentrifugiert gemessen wurde und der Pool zudem nur einen Bruchteil des Volumens der Flaschen hat.

III.A.2.2.2.2. Adulte Patienten

A 0 4

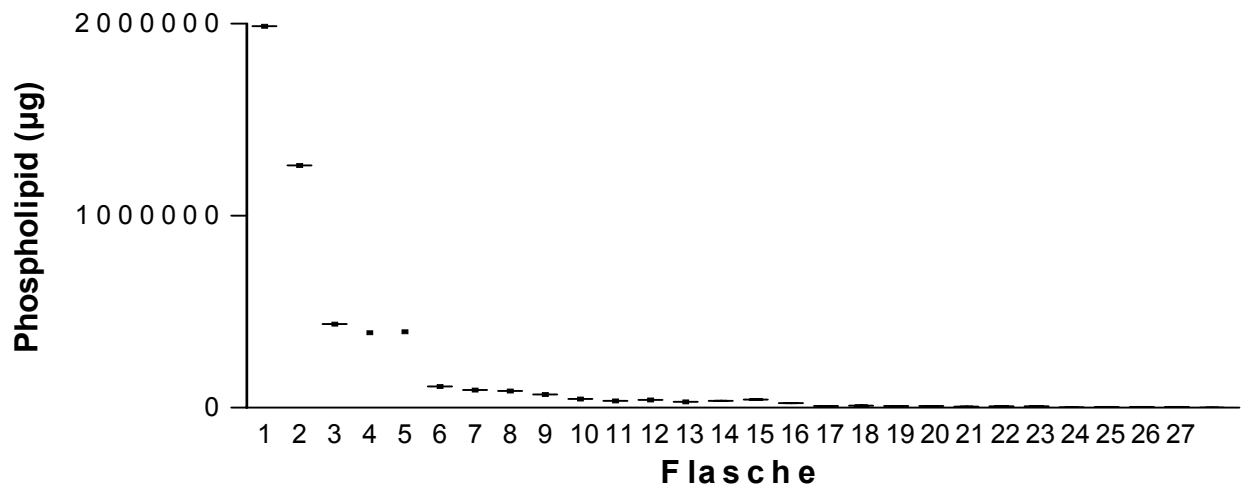


Abb. III.A.2.2.2.2.1.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 1000ml) einer Lungenseite in µg des Patienten A04. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei der adulten Halblungenlavage zeigte sich ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik, welche sich aber gleichmäßiger darstellte als bei den juvenilen Patienten. Nach einem Drittel der Lavage änderte sich die Gesamtmenge an Protein in den Flaschen nicht mehr signifikant.

III.A.2.2.2.3. Cholesterolpneumonitis

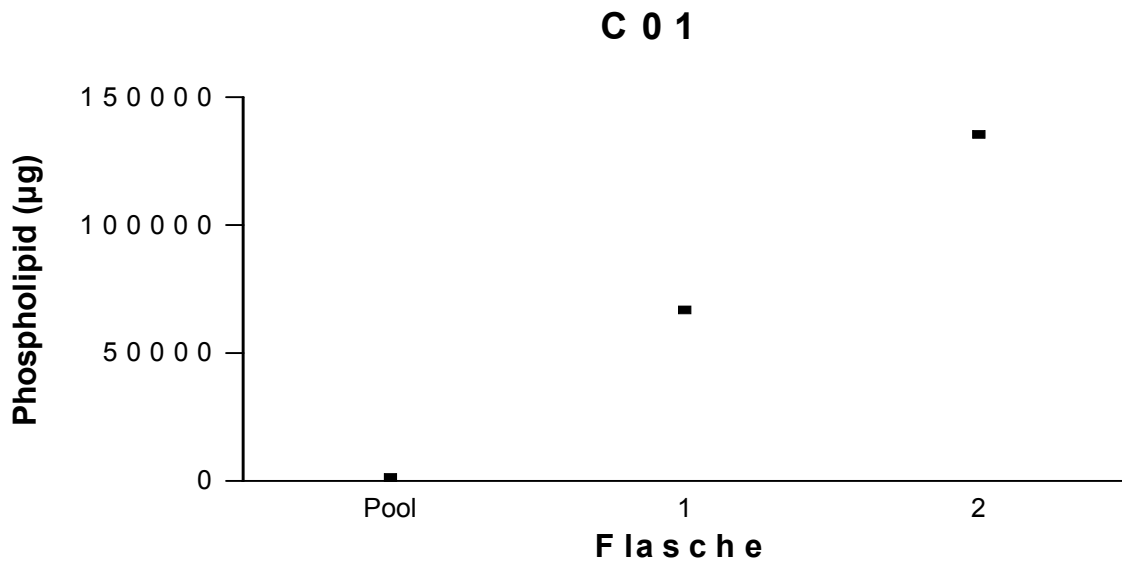


Abb. III.A.2.2.2.3.1.: Darstellung der Gesamtpospholipidmengen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in µg des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die Auswaschkinetik zeigt einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten. Es zeigt sich ein ansteigender Gehalt der Flaschen an Phospholipiden.

III.A.2.2.3. Phospholipid % Gesamt

III.A.2.2.3.1. Juvenile Patienten

Der Restgehalt an Phospholipid, welcher nach der jeweiligen Spülportion noch in der Lunge verblieben ist, wurde als nächstes graphisch dargestellt.

J 0 1

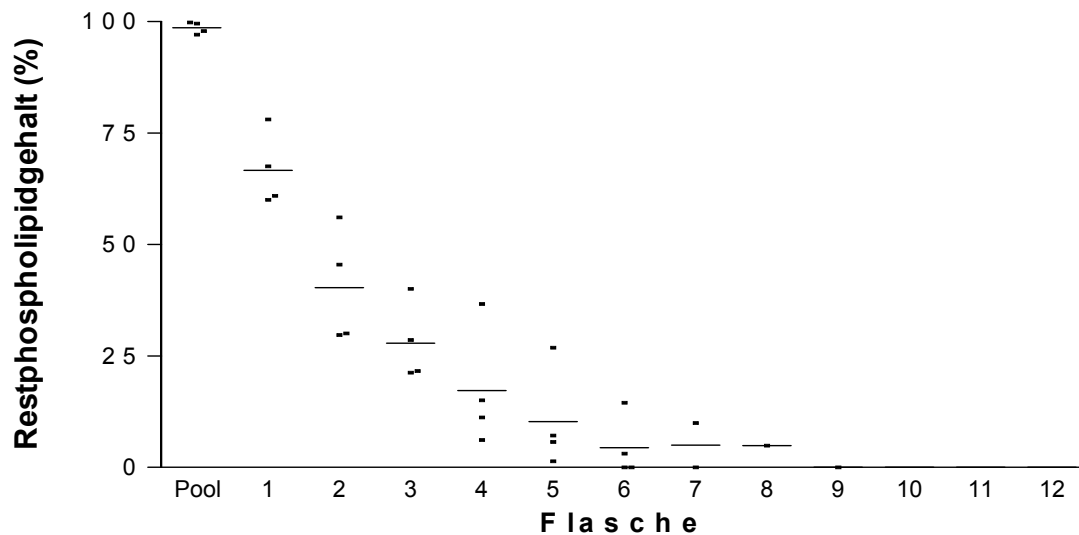


Abb. III.A.2.2.3.1.1.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von 4 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

J 0 2

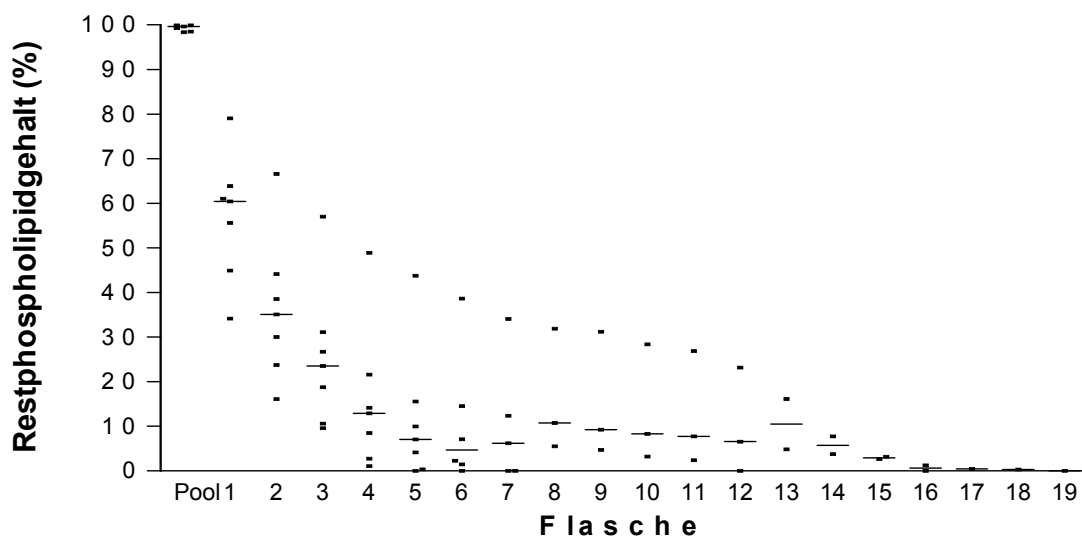


Abb. III.A.2.2.3.1.2.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von 7 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

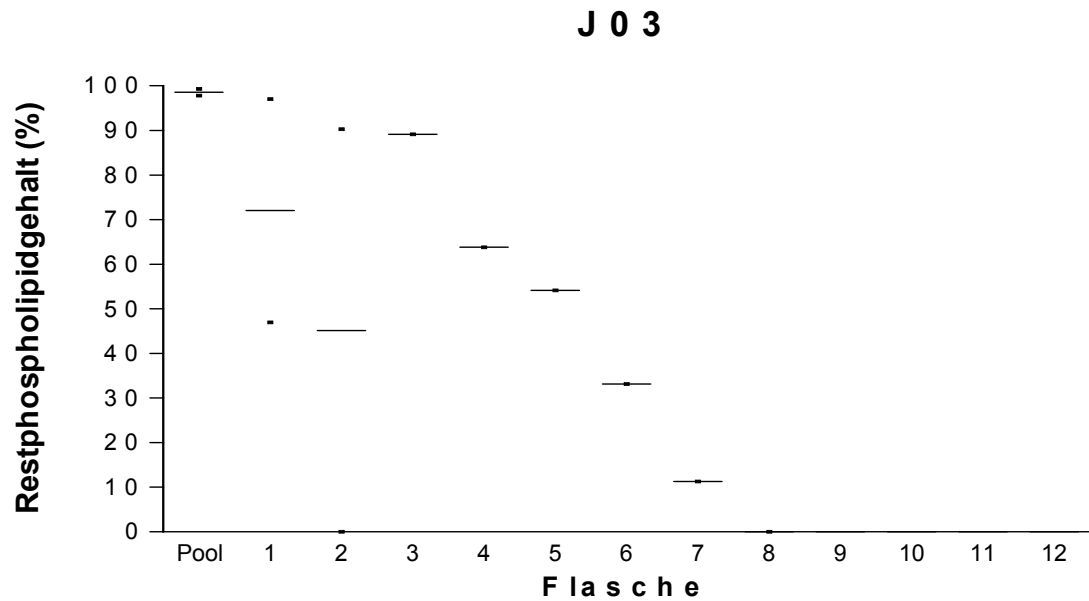


Abb. III.A.2.2.3.1.3.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

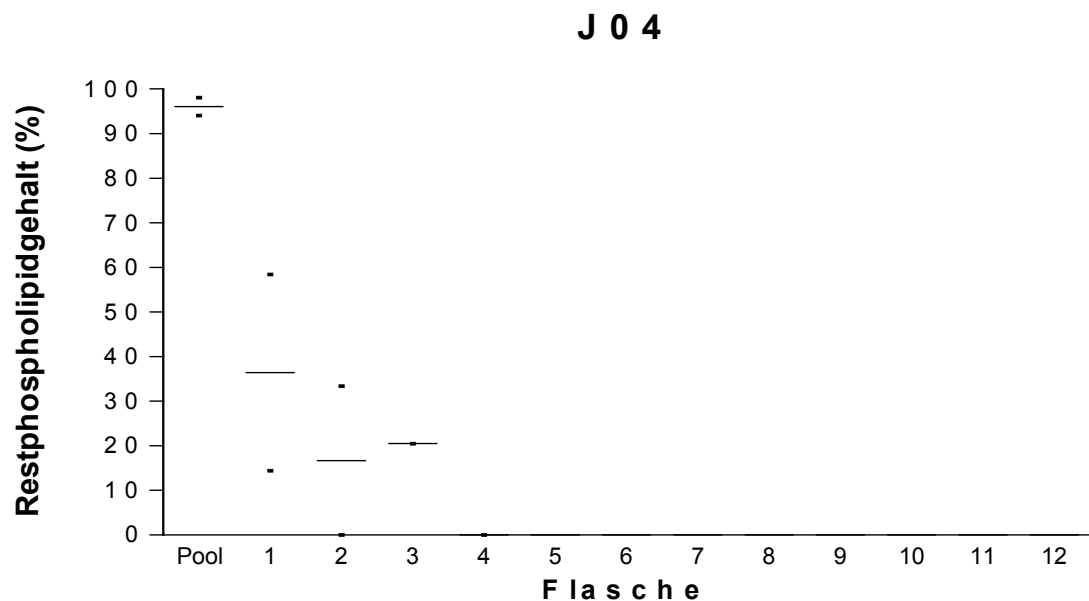


Abb. III.A.2.2.3.1.4.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass der Restphospholipidgehalt in % zu Beginn der Lavage stärker abnimmt als zum Ende der Lavage hin. Insgesamt jedoch zeigt sich bei allen Patienten eine gleichmäßige hyperbole Auswaschkinetik, wie bei der Darstellung der Konzentration. Die Pool Fraktion variiert in sämtlichen Darstellungen nur gering von

100%, was auf das geringe Volumen dieser Fraktion zurückzuführen ist. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lungenseiten.

III.A.2.2.3.2. Adulte Patienten

A 0 4

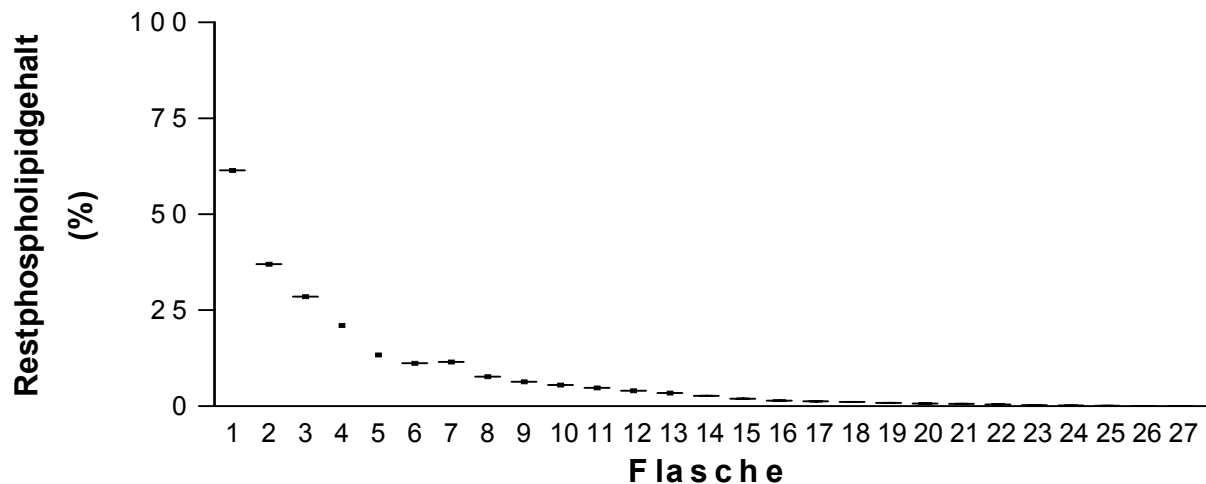


Abb. III.A.2.2.3.2.1.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei der untersuchten Lavage des adulten Patienten zeigte sich ebenfalls eine hyperbole Auswaschkinetik. Zu Beginn der Lavage sank der Restproteingehalt stärker ab als im weiteren Verlauf der Lavage.

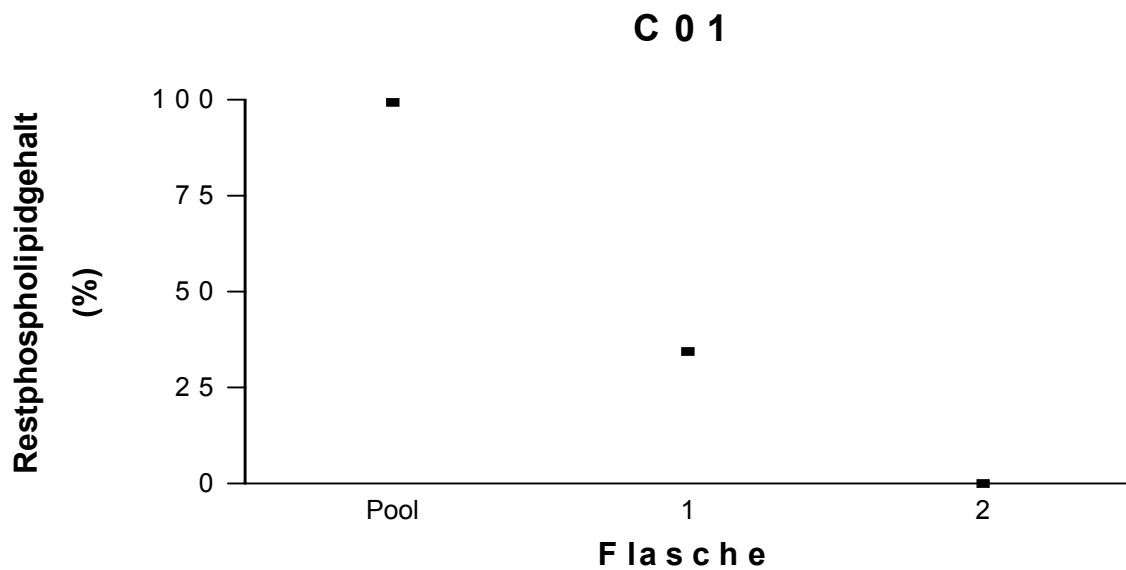
III.A.2.2.3.3. Cholesterolpneumonitis

Abb. III.A.2.2.3.3.1.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavagen der rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für den Patienten mit Cholesterolpneumonitis war die gleiche Auswaschcharakteristik festzustellen wie bei den adulten und juvenilen PAP Patienten.

III.A.2.3. SP-A

III.A.2.3.1. Konzentration

III.A.2.3.1.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden wurden die SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen der juvenilen Patienten untersucht, um die Auswaschkinetik unabhängig von den Auswaschvolumina beurteilen zu können. Die SP-A Konzentrationen wurden mit Hilfe der ELISA Technik bestimmt.

J01

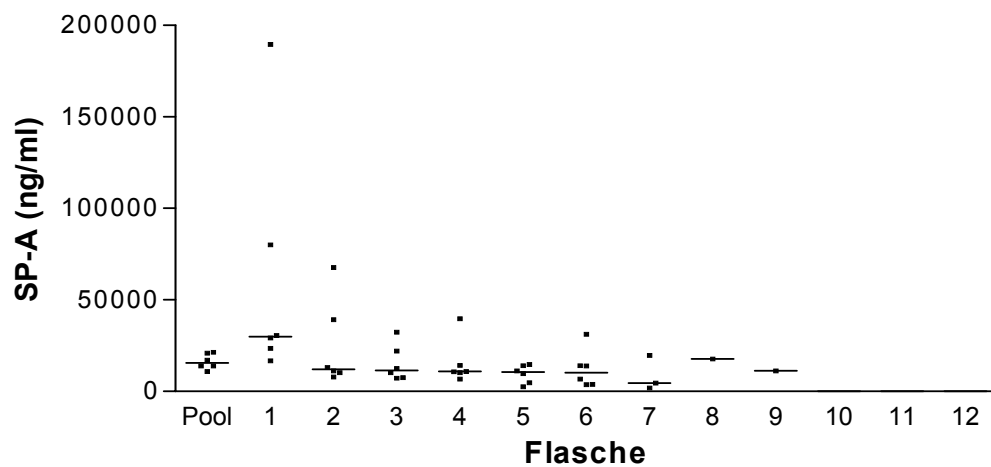


Abb. III.A.2.3.1.1.1.: SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

J02

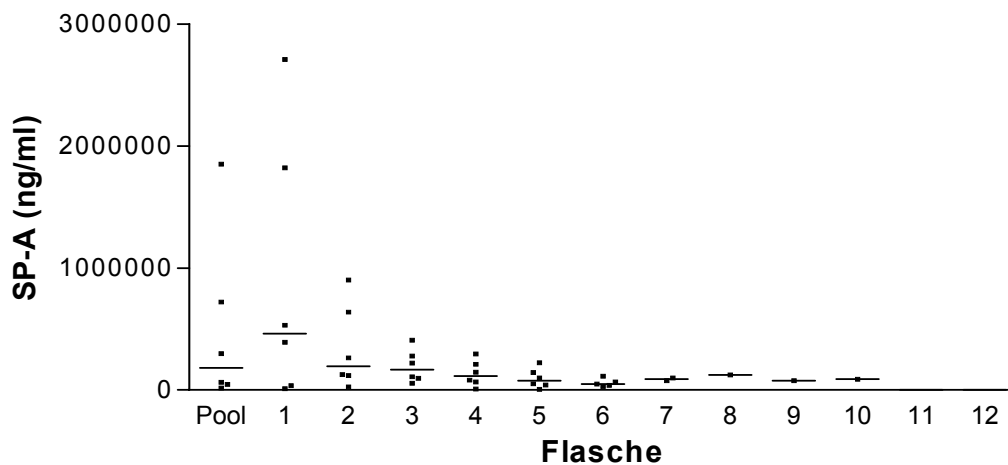


Abb. III.A.2.3.1.1.2.: SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

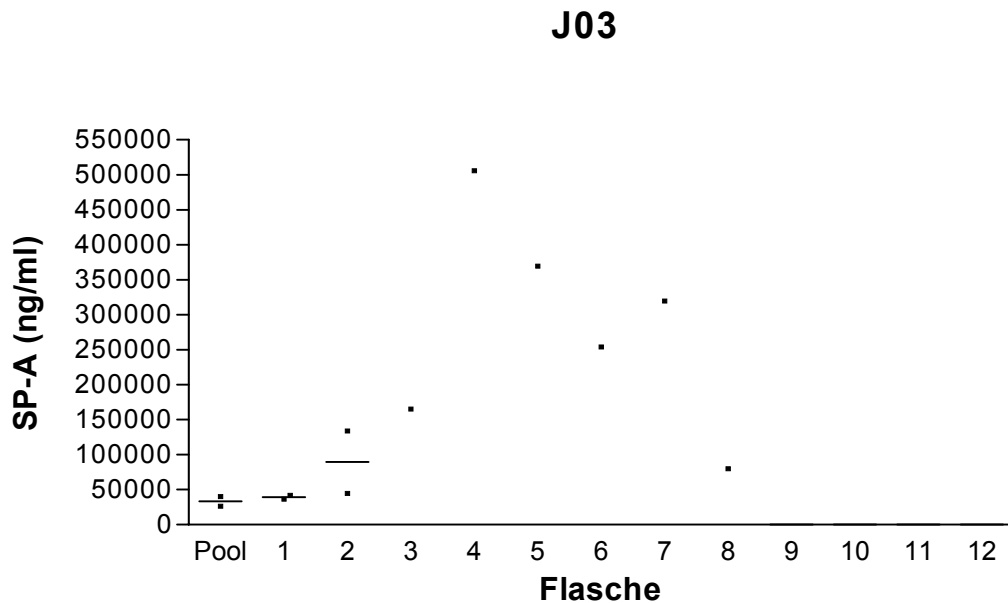


Abb. III.A.2.3.1.1.3.: SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

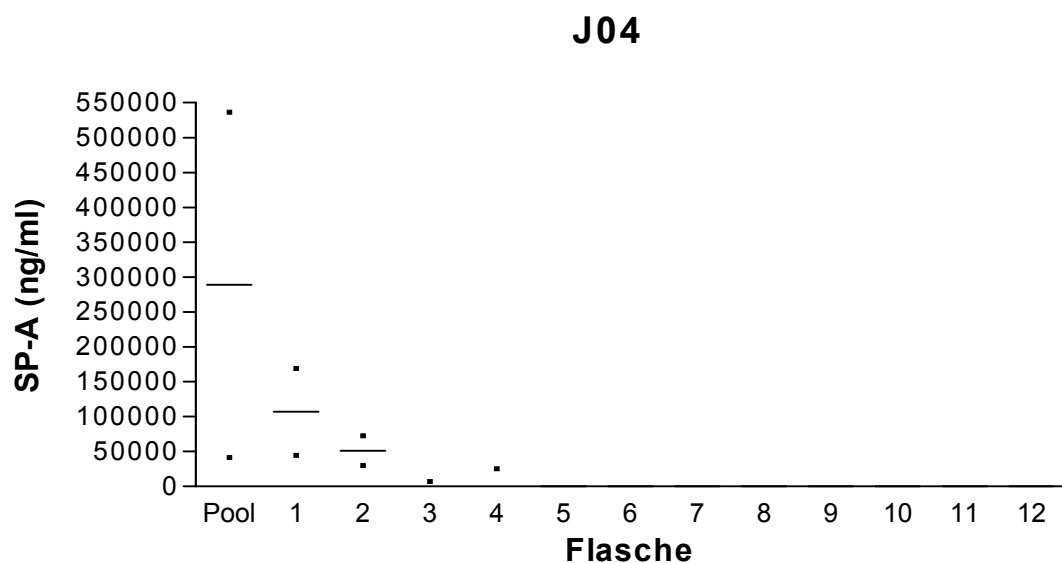


Abb. III.A.2.3.1.1.4.: SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für die Patienten J01, J02 und J04 lässt sich eine hyperbole Auswaschkinetik erkennen. Bei dem Patienten J03 ist keine einheitliche Auswaschkinetik erkennbar. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Pool Fraktionen eine geringere Konzentration aufweisen als die folgende 1. Flasche. Dies liegt daran, dass die Pool Fraktion nur

zentrifugiert zur Verfügung stand, was einen Konzentrationsverlust von ca. 30 % bedingt (siehe Material und Methoden). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der rechten und linken Lungenseite.

III.A.2.3.1.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-A Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.3.1.3. Cholesterlpneumonitis

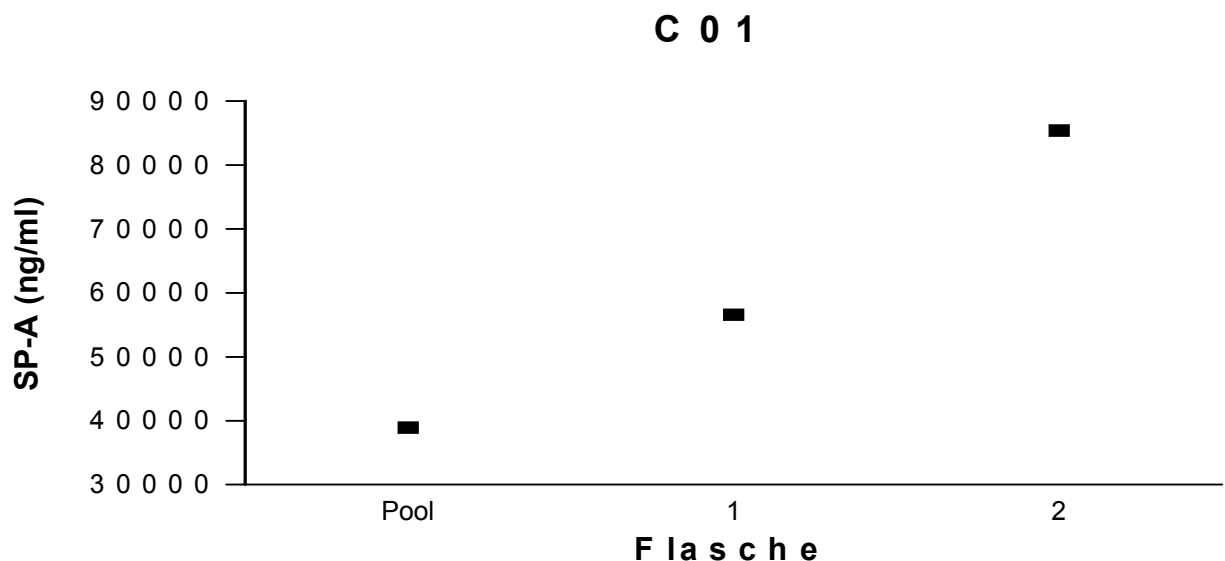


Abb. III.A.2.3.1.3.1.: SP-A Konzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der SP-A Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Der Patient mit Cholesterlpneumonitis dient als Kontrollpatient, da er als einziger Patient ohne die endgültige Diagnose pulmonale Alveolarproteinose über mehrere Spülflaschen lavagiert worden ist. Die Auswaschkinetik zeigt einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten und die Konzentrationen der einzelnen Spülportionen steigen an. Die höchste SP-A Konzentration befindet sich in der 2. Spülportion.

III.A.2.3.2. Gesamtmenge je 500ml Portion

III.A.2.3.2.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden sollte die Effektivität der Lungenspülung anhand der Gesamtmenge an SP-A gezeigt werden, welche in den einzelnen Flaschen und der Pool Fraktion

vorhanden war. Die Werte ergaben sich aus der Multiplikation der Konzentrationen der einzelnen Portion mit den Volumina.

J01

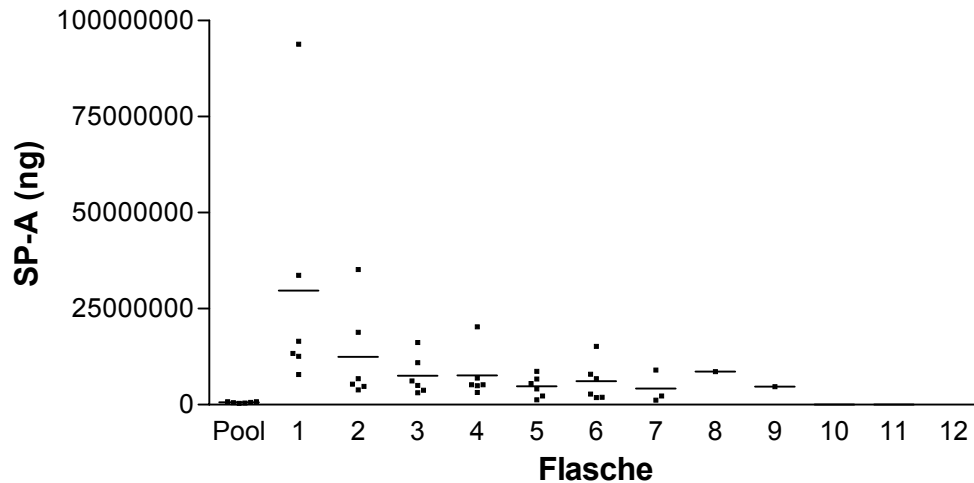


Abb. III.A.2.3.2.1.1.: Darstellung der gesamten SP-A Menge der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

J02

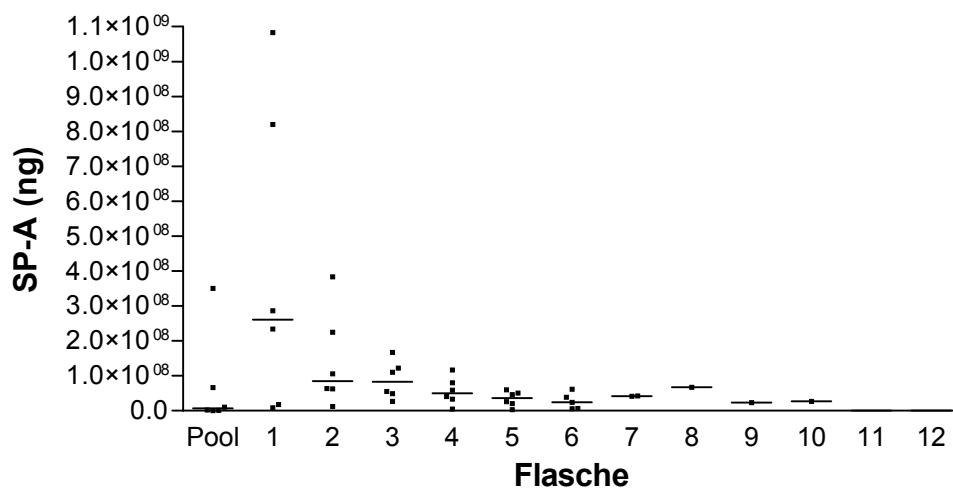


Abb. III.A.2.3.2.1.2.: Darstellung der gesamten SP-A Menge der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

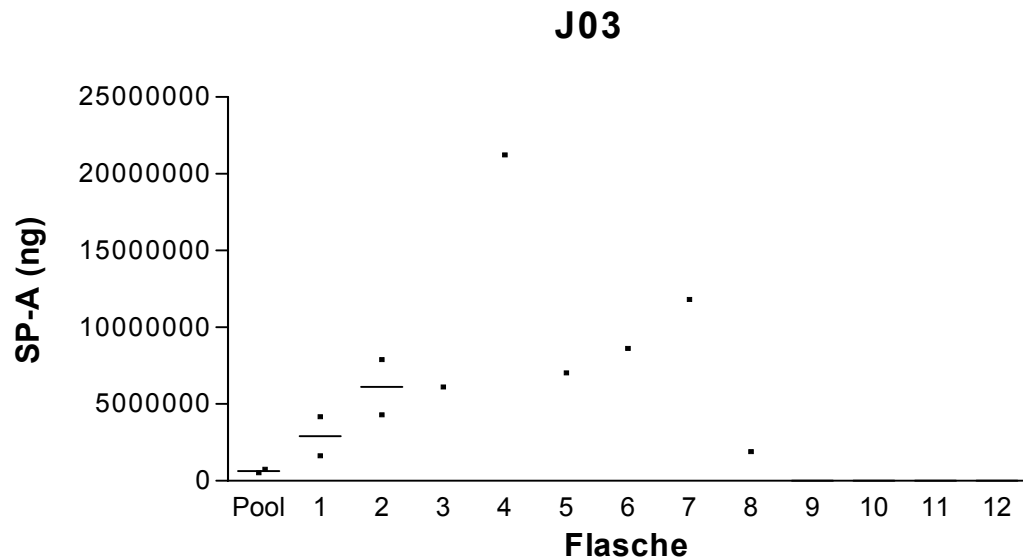


Abb. III.A.2.3.2.1.3.: Darstellung der gesamten SP-A Menge der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

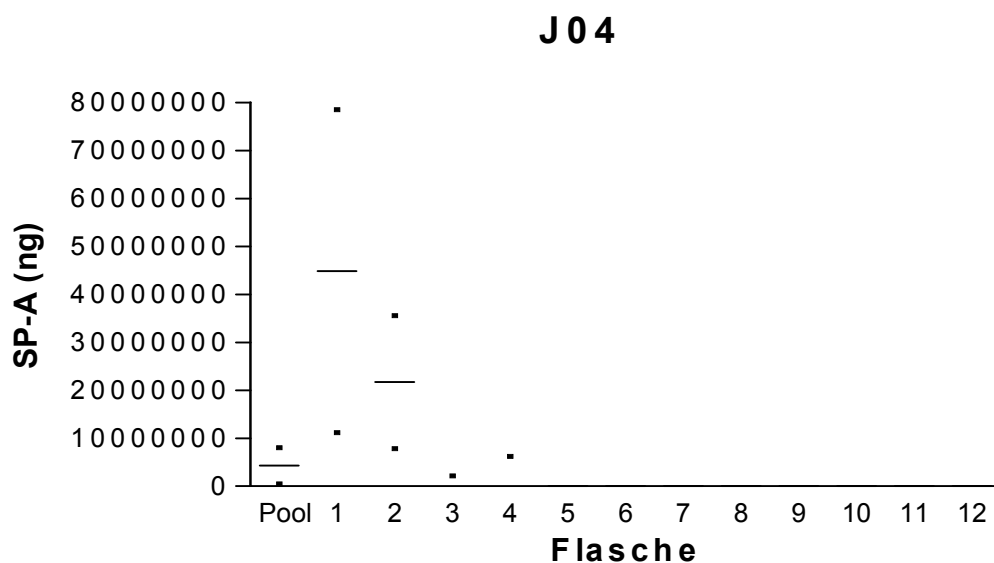


Abb. III.A.2.3.2.1.4.: Darstellung der gesamten SP-A Menge der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamtmenge an SP-A in den einzelnen Flaschen über die Dauer der Lavage abnimmt. Nur der Patient J03 zeigt kein einheitliches Auswaschmuster. Die Pool Fraktion zeigt in sämtlichen Darstellungen die geringste

Menge an SP-A, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pool Fraktion nur zentrifugiert gemessen wurde und der Pool zudem nur einen Bruchteil des Volumens der Flaschen hat.

III.A.2.3.2.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-A Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.3.2.3. Cholesterolpneumonitis

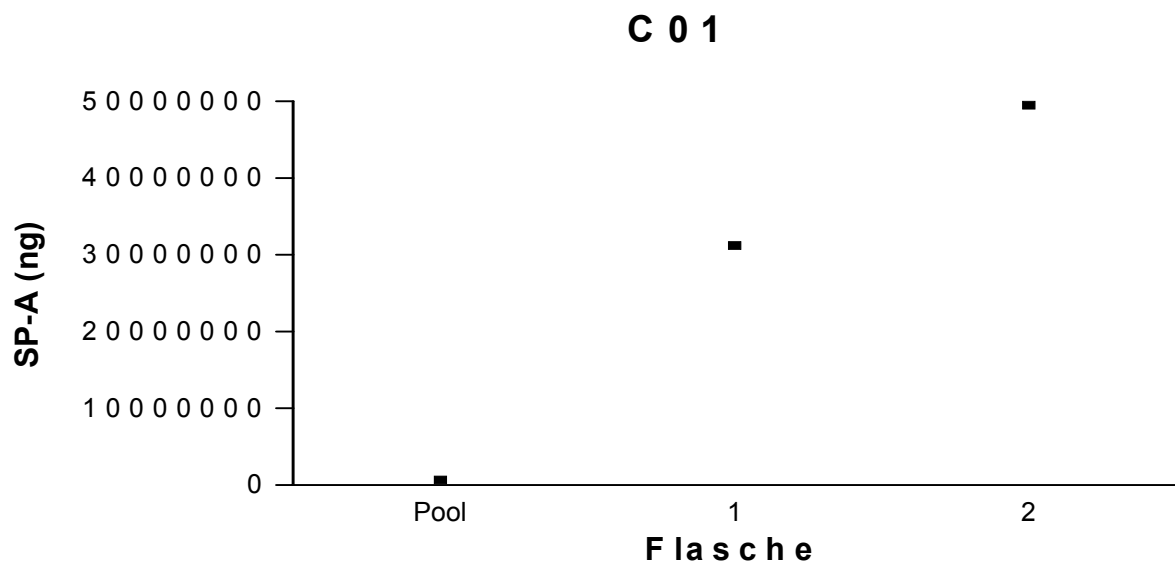


Abb. III.A.2.3.2.3.1.: Darstellung der gesamten SP-A Menge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der SP-A Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die Auswaschkinetik zeigt einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten. Es zeigt sich ein ansteigender Gehalt der Flaschen an SP-A.

III.A.2.3.3. SP-A% Gesamt

III.A.2.3.3.1. Juvenile Patienten

Der Restgehalt an SP-A, welcher nach der jeweiligen Spülportion noch in der Lunge verblieben ist, wurde als nächstes graphisch dargestellt.

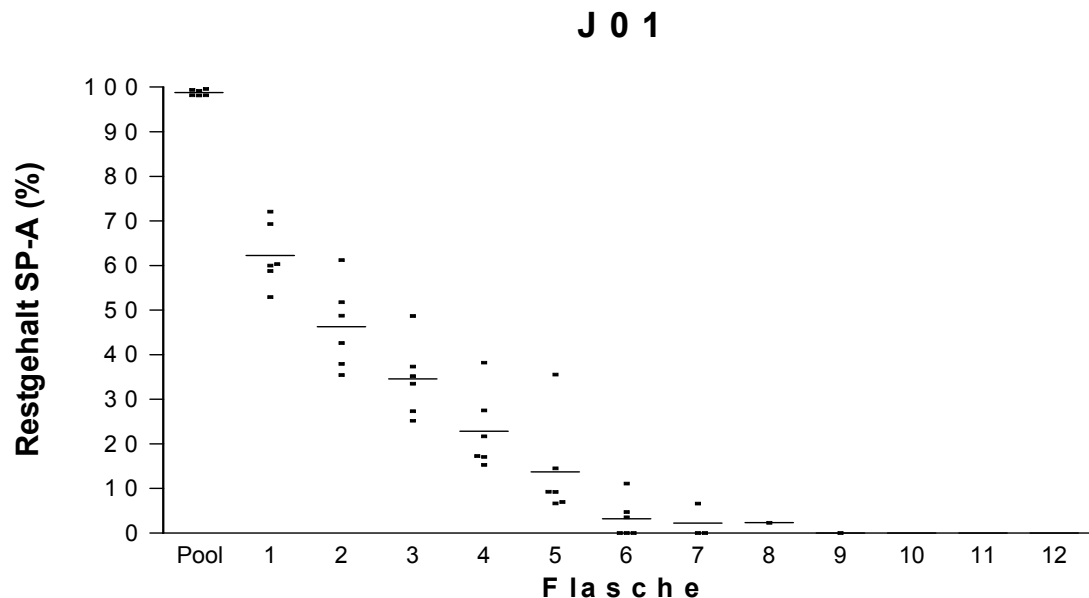


Abb. III.A.2.3.3.1.1.: Darstellung des Restgehaltes an SP-A, der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-A Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-A Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

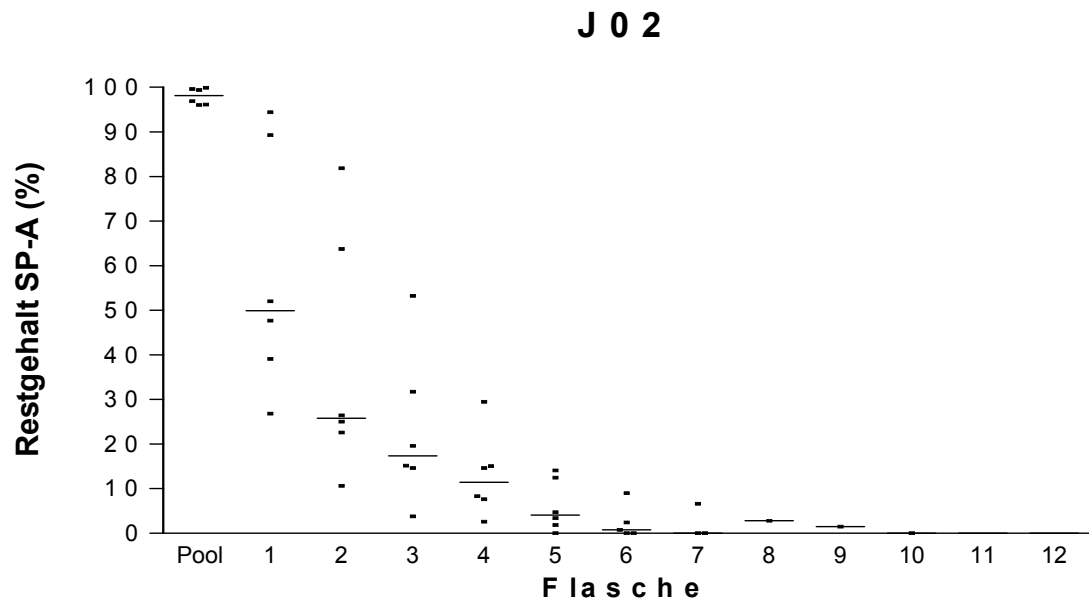


Abb. III.A.2.3.3.1.2.: Darstellung des Restgehaltes an SP-A, der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-A Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-A Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

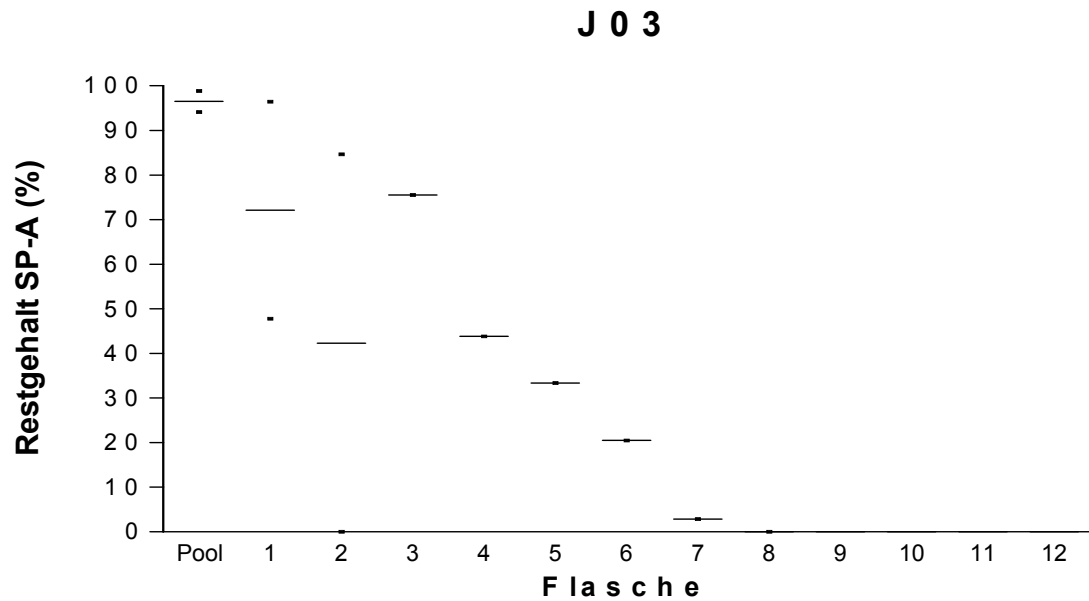


Abb. III.A.2.3.3.1.3.: Darstellung des Restgehaltes an SP-A, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-A Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-A Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

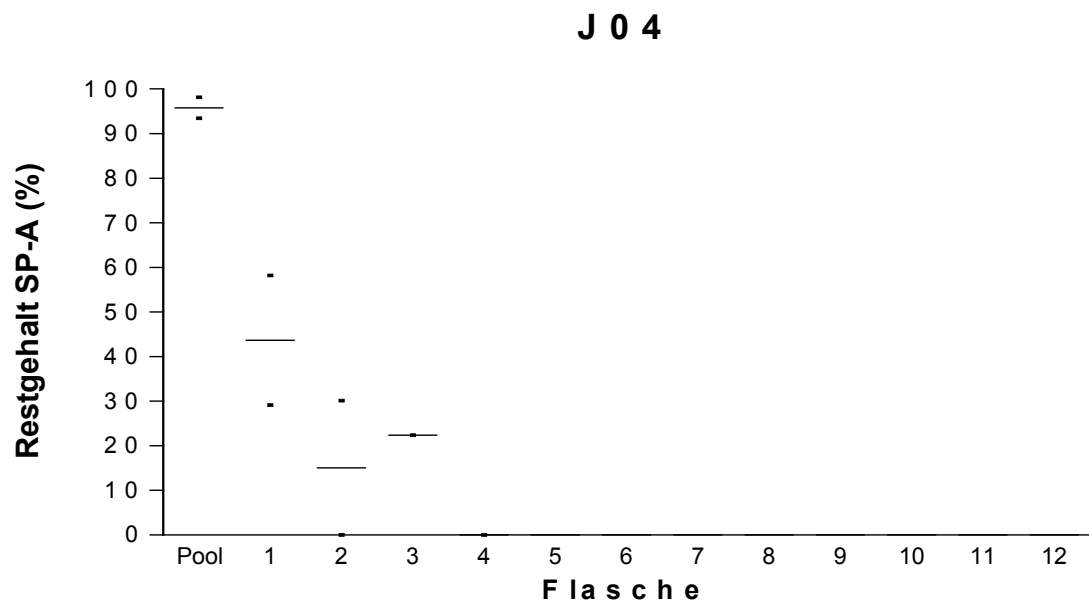


Abb. III.A.2.3.3.1.4.: Darstellung des Restgehaltes an SP-A, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-A Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-A Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass der Restgehalt an SP-A in % zu Beginn der Lavage stärker abnimmt als zum Ende der Lavage hin. Insgesamt jedoch zeigt sich bei allen Patienten eine gleichmäßige hyperbole Auswaschkinetik, wie bei der Darstellung der Konzentration. Die Pool Fraktion variiert in sämtlichen Darstellungen nur gering von

100%, was auf das geringe Volumen dieser Fraktion zurückzuführen ist. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lungenseiten.

III.A.2.3.3.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-A Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.3.3.3. Cholesterlpneumonitis

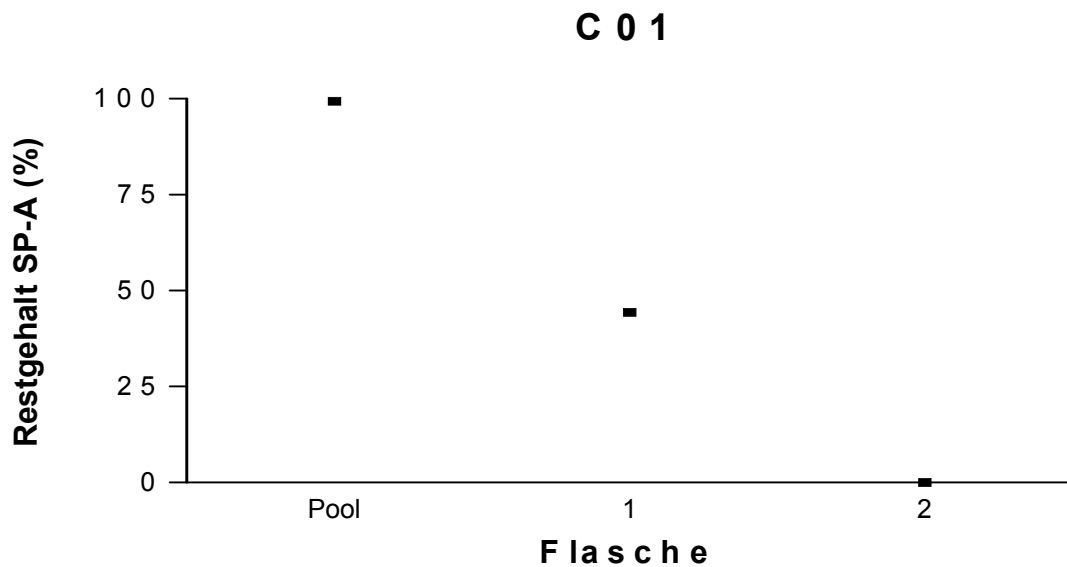


Abb. III.A.2.3.3.3.1.: Darstellung des Restgehaltes an SP-A, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavagen der rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-A Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-A Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für den Patienten mit Cholesterlpneumonitis war die gleiche Auswaschcharakteristik festzustellen wie für die adulten und juvenilen PAP Patienten.

III.A.2.4. SP-D

III.A.2.4.1. Konzentration

III.A.2.4.1.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden wurden die SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen der juvenilen Patienten untersucht, um die Auswaschkinetik, unabhängig von den Auswaschvolumina beurteilen zu können. Die SP-D Konzentrationen wurden mit Hilfe der ELISA Technik bestimmt.

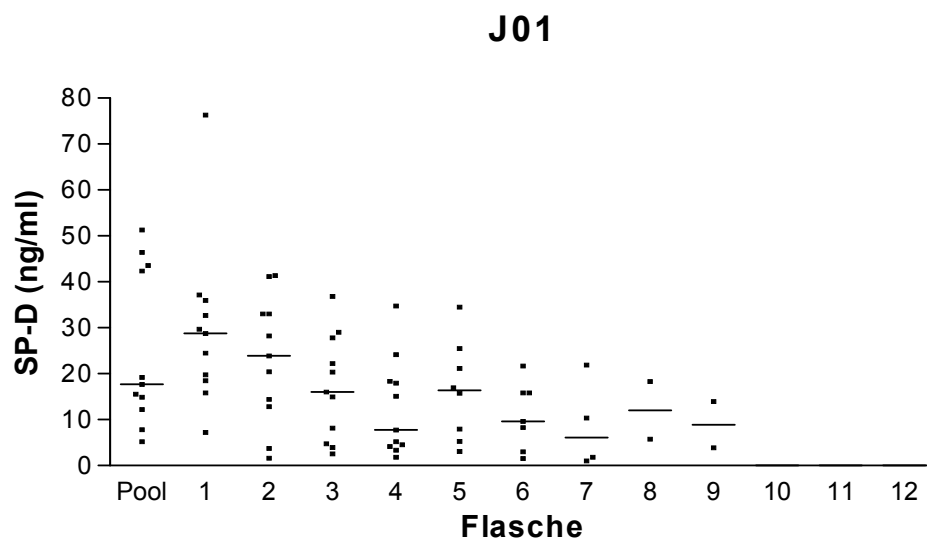


Abb. III.A.2.4.1.1.1.: SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 11 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

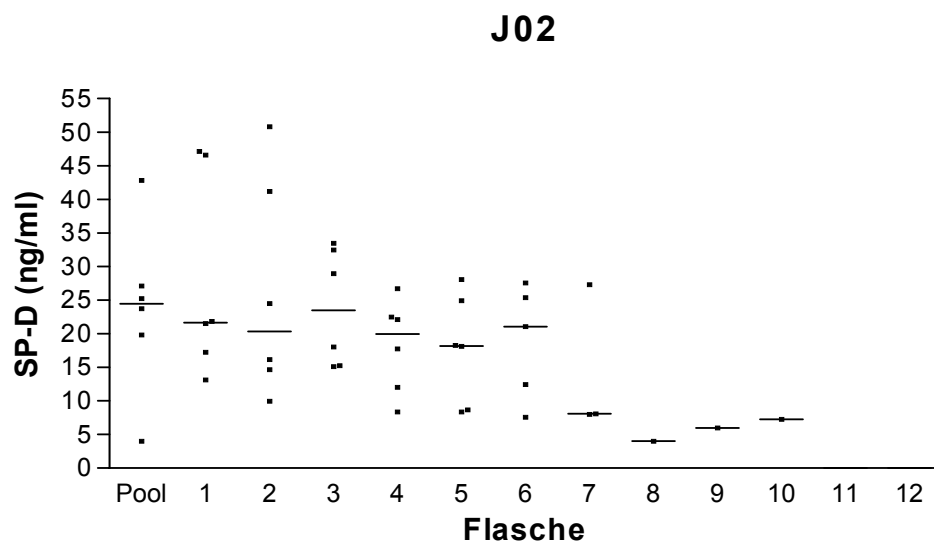


Abb. III.A.2.4.1.1.2.: SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

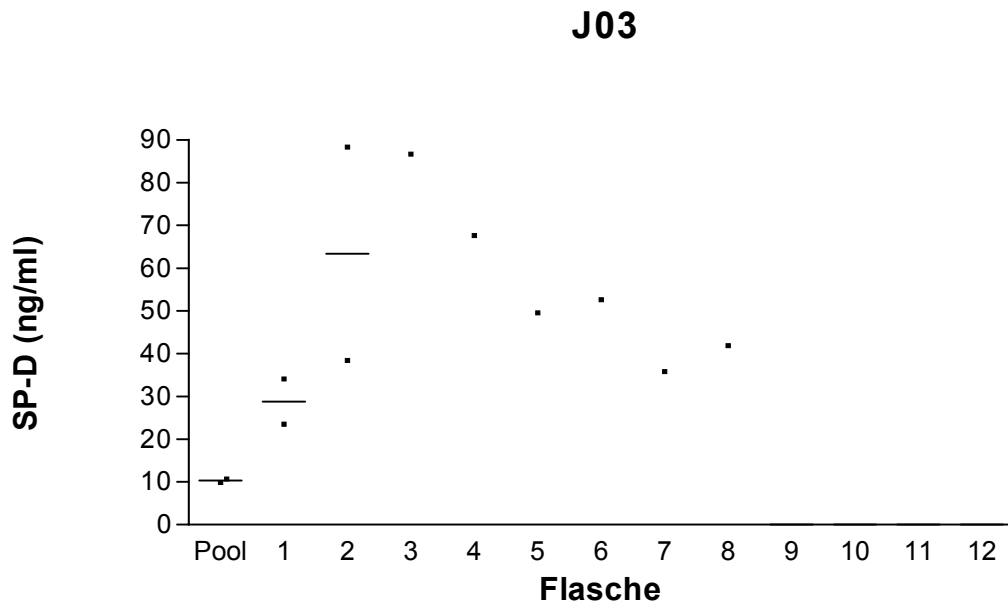


Abb. III.A.2.4.1.1.3.: SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

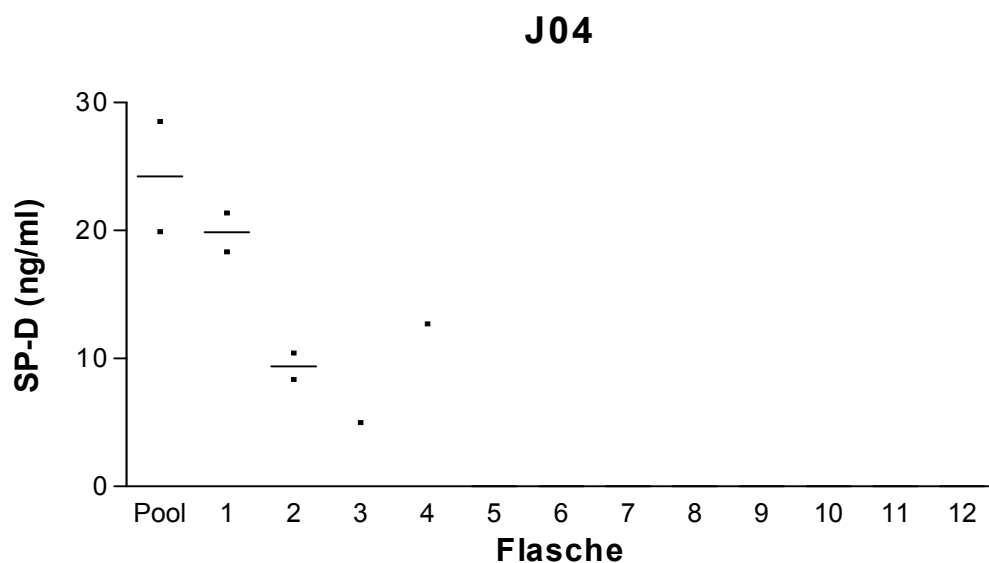


Abb. III.A.2.4.1.1.4.: SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für die Patienten J01, J02 und J04 lässt sich eine hyperbole Auswaschkinetik erkennen. Bei dem Patienten J03 ist keine einheitliche Auswaschkinetik erkennbar. Es ist zu beachten, dass die jeweiligen Pool Fraktionen eine geringere Konzentration aufweisen als die folgende 1. Flasche. Dies liegt daran, dass die Pool Fraktion nur

zentrifugiert zur Verfügung stand, was einen Konzentrationsverlust von ca. 30 % bedingt (siehe Material und Methoden). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der rechten und linken Lungenseite.

III.A.2.4.1.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-D Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.4.1.3. Cholesterolpneumonitis

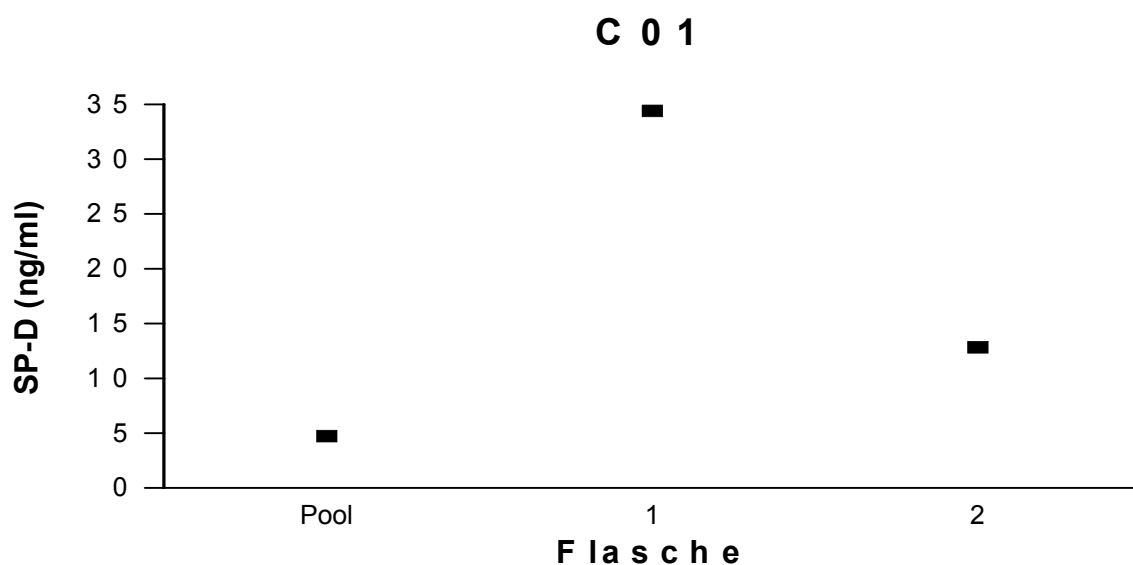


Abb. III.A.2.4.1.3.1.: SP-D Konzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der SP-D Konzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) in ng/ml des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Der Patient mit Cholesterolpneumonitis dient als Kontrollpatient, da er als einziger Patient ohne die endgültige Diagnose pulmonale Alveolarproteinose über mehrere Spülflaschen lavagiert worden ist. Die Auswaschkinetik einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten, die Konzentrationen der einzelnen Spülportionen steigen an. Die höchste SP-A Konzentration befindet sich in der 2. Spülportion.

III.A.2.4.2. Gesamtmenge je 500ml Portion

III.A.2.4.2.1. Juvenile Patienten

Im Folgenden sollte die Effektivität der Lungenspülung anhand der Gesamtmenge an SP-D gezeigt werden, welche in den einzelnen Flaschen und der Pool Fraktion

vorhanden war. Die Werte ergaben sich aus der Multiplikation der Konzentrationen der einzelnen Portion mit den Volumina.

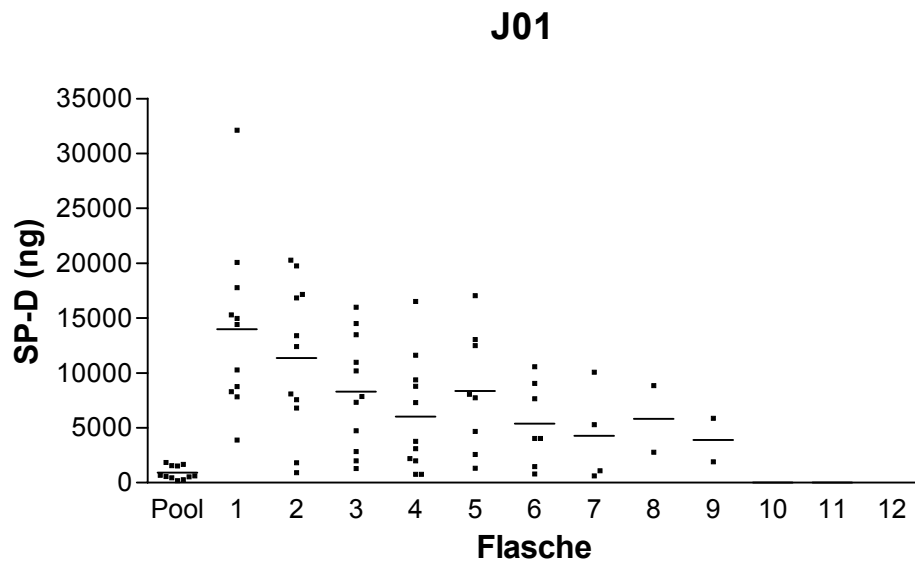


Abb. III.A.2.4.2.1.1.: Darstellung der gesamten SP-D Menge der einzelnen Flaschen von 11 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J01. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

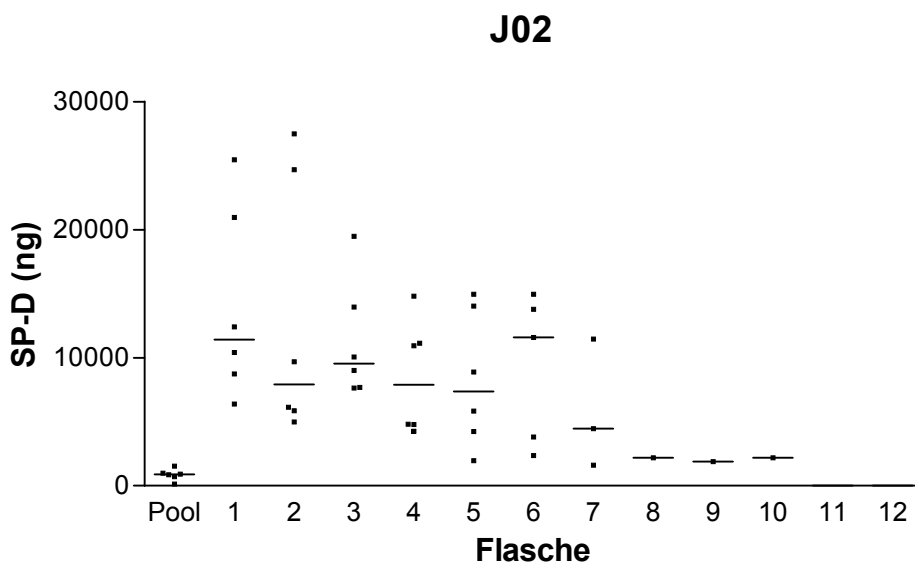


Abb. III.A.2.4.2.1.2.: Darstellung der gesamten SP-D Menge der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J02. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

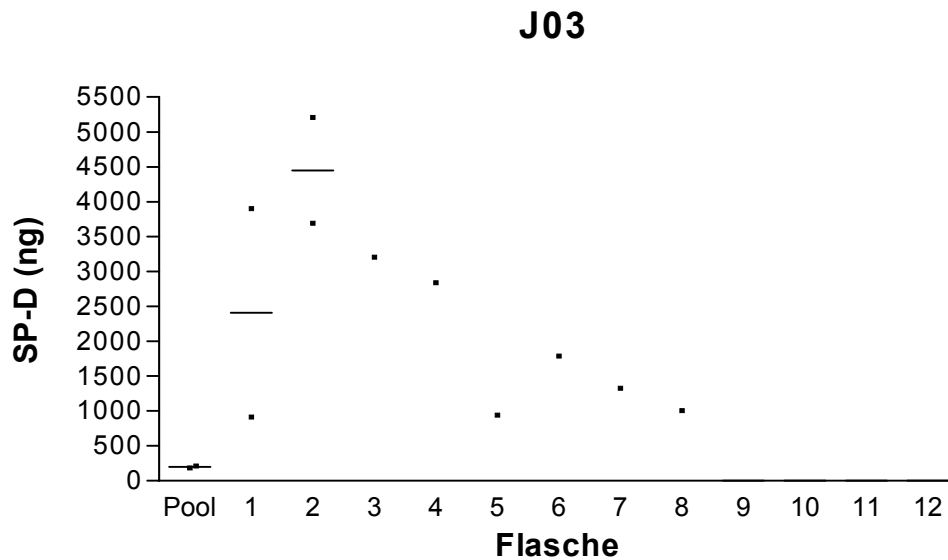


Abb. III.A.2.4.2.1.3.: Darstellung der gesamten SP-D Menge der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J03. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

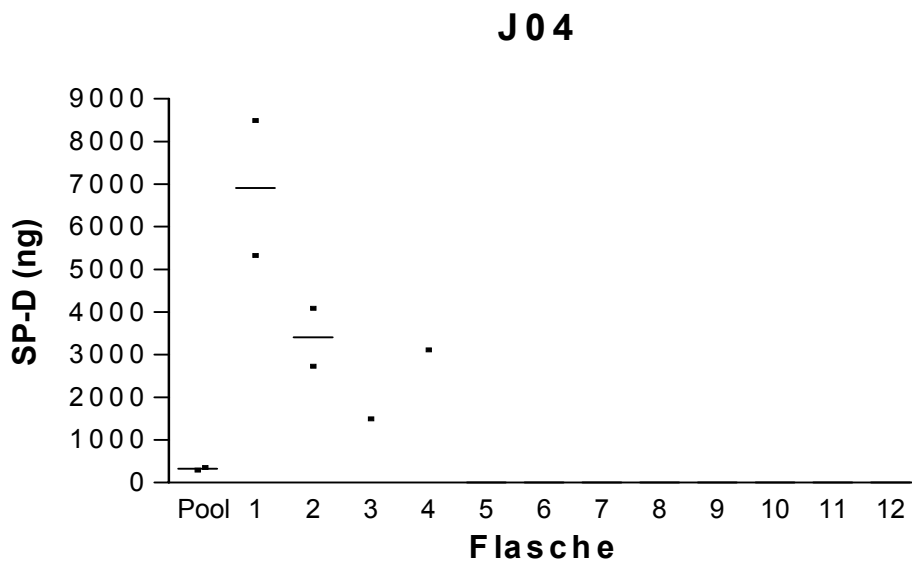


Abb. III.A.2.4.2.1.4.: Darstellung der gesamten SP-D Menge der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten J04. Mediane sind gegeben. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass die Gesamtmenge an SP-D in den einzelnen Flaschen über die Dauer der Lavage abnimmt. Auch der Patient J03 zeigt ein nahezu einheitliches Auswaschmuster. Die Pool Fraktion zeigt in sämtlichen Darstellungen die geringste Menge an SP-D, was darauf zurückzuführen ist, dass die Pool Fraktion nur

zentrifugiert gemessen wurde und der Pool zudem nur einen Bruchteil des Volumens der Flaschen hat.

III.A.2.4.2.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-D Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.4.2.3. Cholesterlpneumonitis

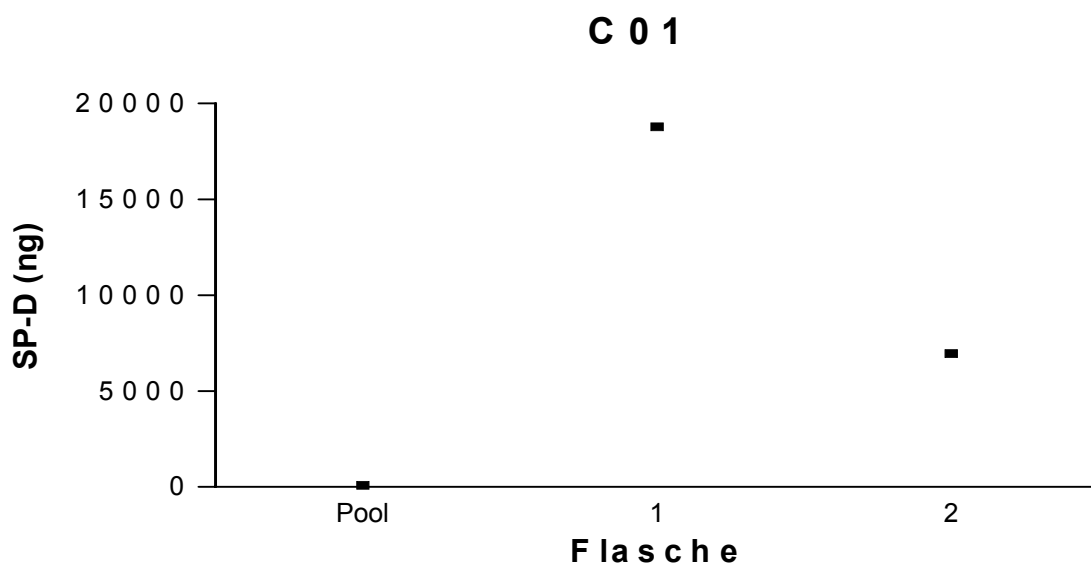


Abb. III.A.2.4.2.3.1.: Darstellung der gesamten SP-D Menge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage. Ein Symbol entspricht der SP-D Menge in einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500ml) einer Lungenseite in ng des Patienten C01. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Die Auswaschkinetik zeigt einen gegensätzlichen Verlauf wie die Kinetik der PAP Patienten. Es zeigt sich ein ansteigender Gehalt der Flaschen an SP-D.

III.A.2.4.3. SP-D% Gesamt

III.A.2.4.3.1. Juvenile Patienten

Der Restgehalt an SP-D, welcher noch in der Lunge verblieben ist, nach der jeweiligen Spülportion wurde als nächstes graphisch dargestellt.

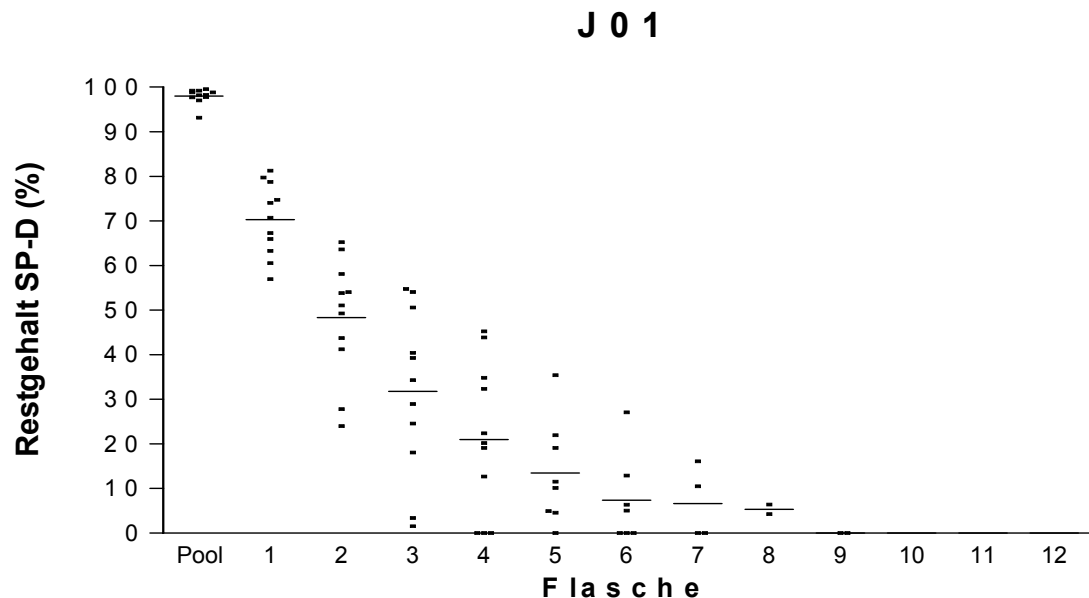


Abb. III.A.2.4.3.1.1.: Darstellung des Restgehaltes an SP-D, der einzelnen Flaschen von 11 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-D Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-D Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

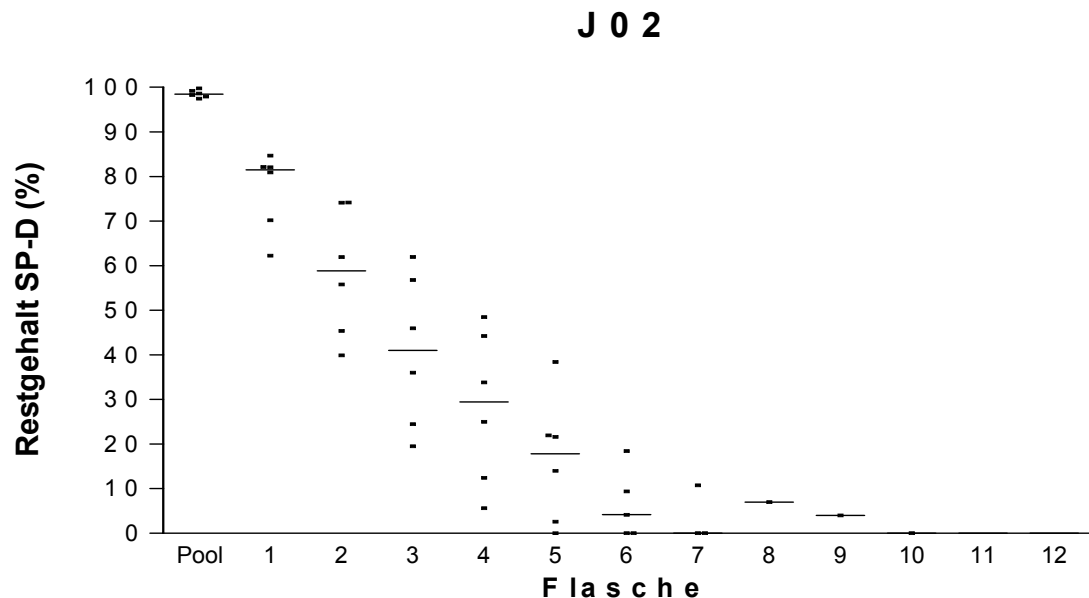


Abb. III.A.2.4.3.1.2.: Darstellung des Restgehaltes an SP-D, der einzelnen Flaschen von 6 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-D Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-D Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

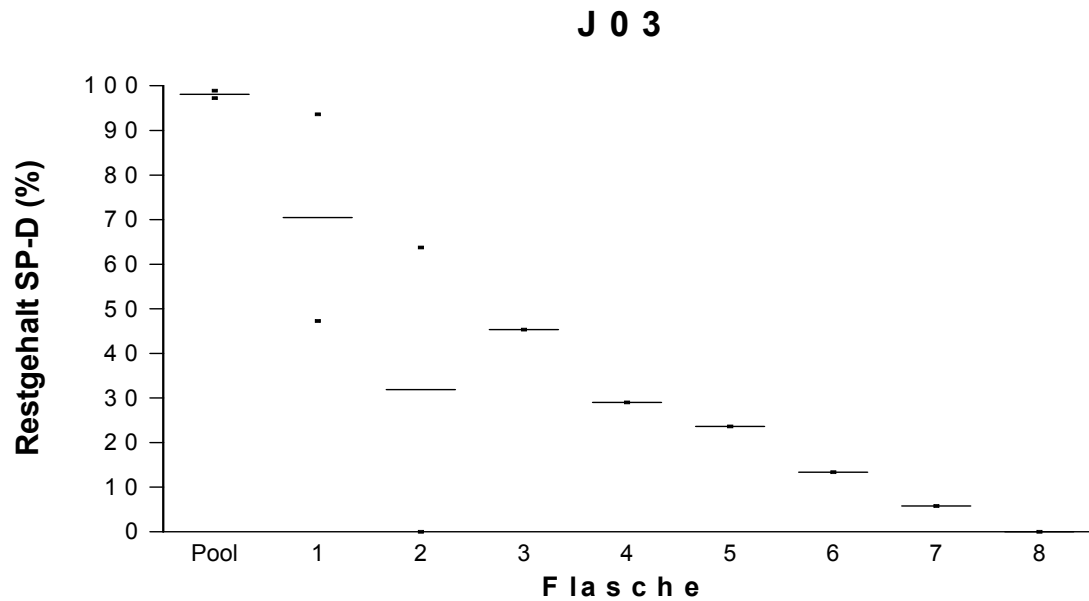


Abb. III.A.2.4.3.1.3.: Darstellung des Restgehaltes an SP-D, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-D Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-D Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

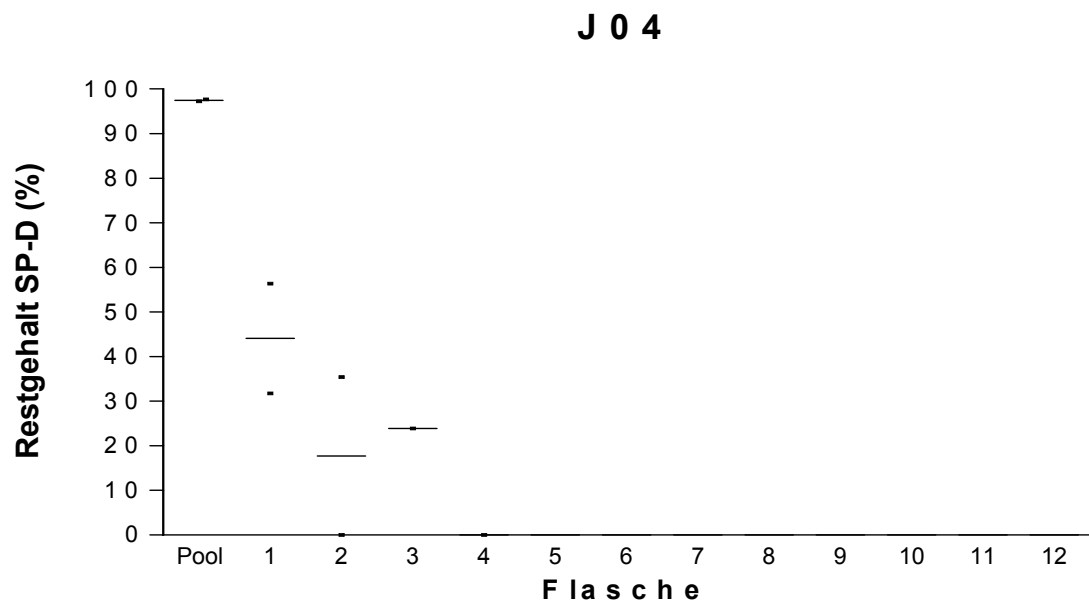


Abb. III.A.2.4.3.1.4.: Darstellung des Restgehaltes an SP-D, der einzelnen Flaschen von 2 Halblungenlavagen der linken und rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-D Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-D Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ist zu erkennen, dass der Restgehalt an SP-D in % zu Beginn der Lavage stärker abnimmt als zum Ende der Lavage hin. Insgesamt jedoch zeigt sich bei allen Patienten eine gleichmäßige hyperbole Auswaschkinetik, wie bei der Darstellung der Konzentration. Die Pool Fraktion variiert in sämtlichen Darstellungen nur gering von

100%, was auf das geringe Volumen dieser Fraktion zurückzuführen ist. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lungenseiten.

III.A.2.4.3.2. Adulte Patienten

Adulte PAP Patienten wurden nicht auf ihren SP-D Gehalt in den einzelnen Spülportionen untersucht.

III.A.2.4.3.3. Cholesterlpneumonitis

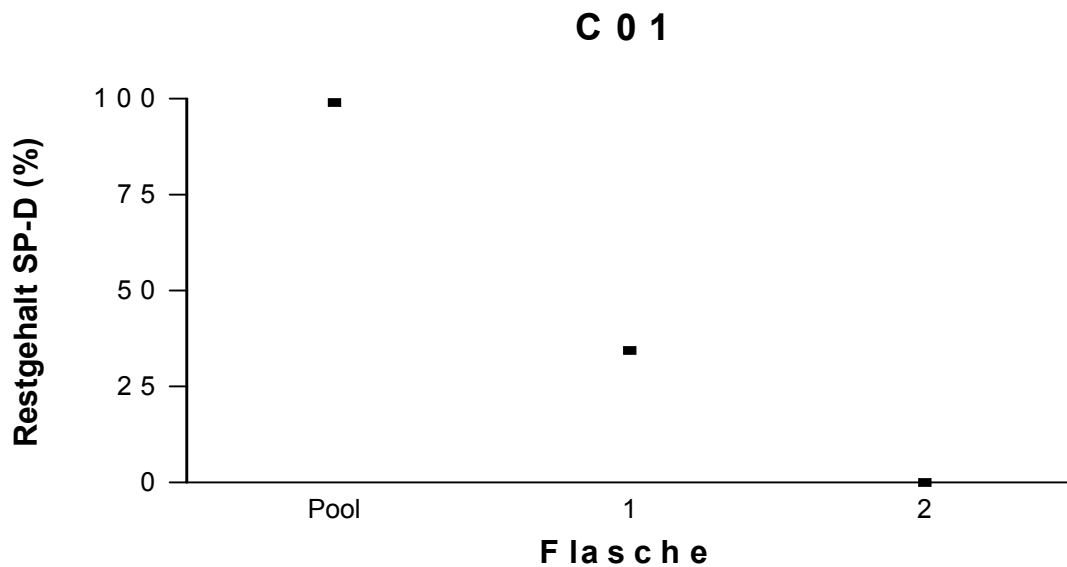


Abb. III.A.2.4.3.3.1.: Darstellung des Restgehaltes an SP-D, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavagen der rechten Lungenseite, welcher noch in der Lunge verbleibt in %. Ein Symbol entspricht der gesamten SP-D Menge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen SP-D Menge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Für den Patienten mit Cholesterlpneumonitis war die gleiche Auswaschcharakteristik festzustellen wie für die adulten und juvenilen PAP Patienten.

III.A.2.5. SP-C mittels 1D Gelelektrophorese und Immunoblot bei Patient J01

III.A.2.5.1. Reduzierte Form

Das Verhalten des SP-C des Patienten J01 während einer Lavage wurde durch eine eindimensionale Auftrennung des Pools und aller Flaschen der Ganzlungenlavage von J01 vom 5.6.00 dargestellt.

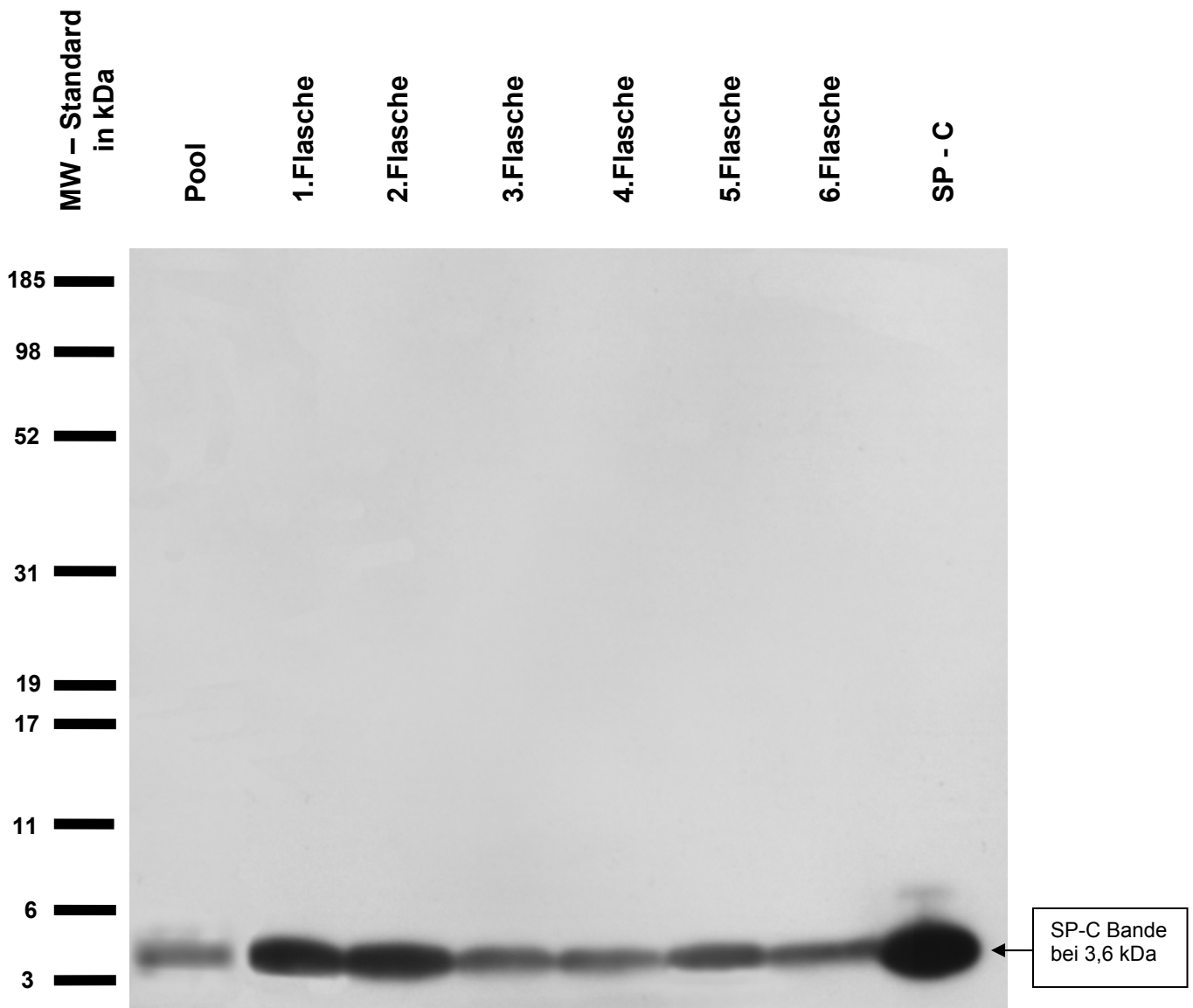


Abb.II.A.2.5.1.1.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Auftragsmenge betrug jeweils 5 µg Gesamtprotein. Es ist zu erkennen, dass die SP-C Konzentration im Verlauf der Lavage abnimmt.

III.A.2.5.2. Nicht - reduzierte Form

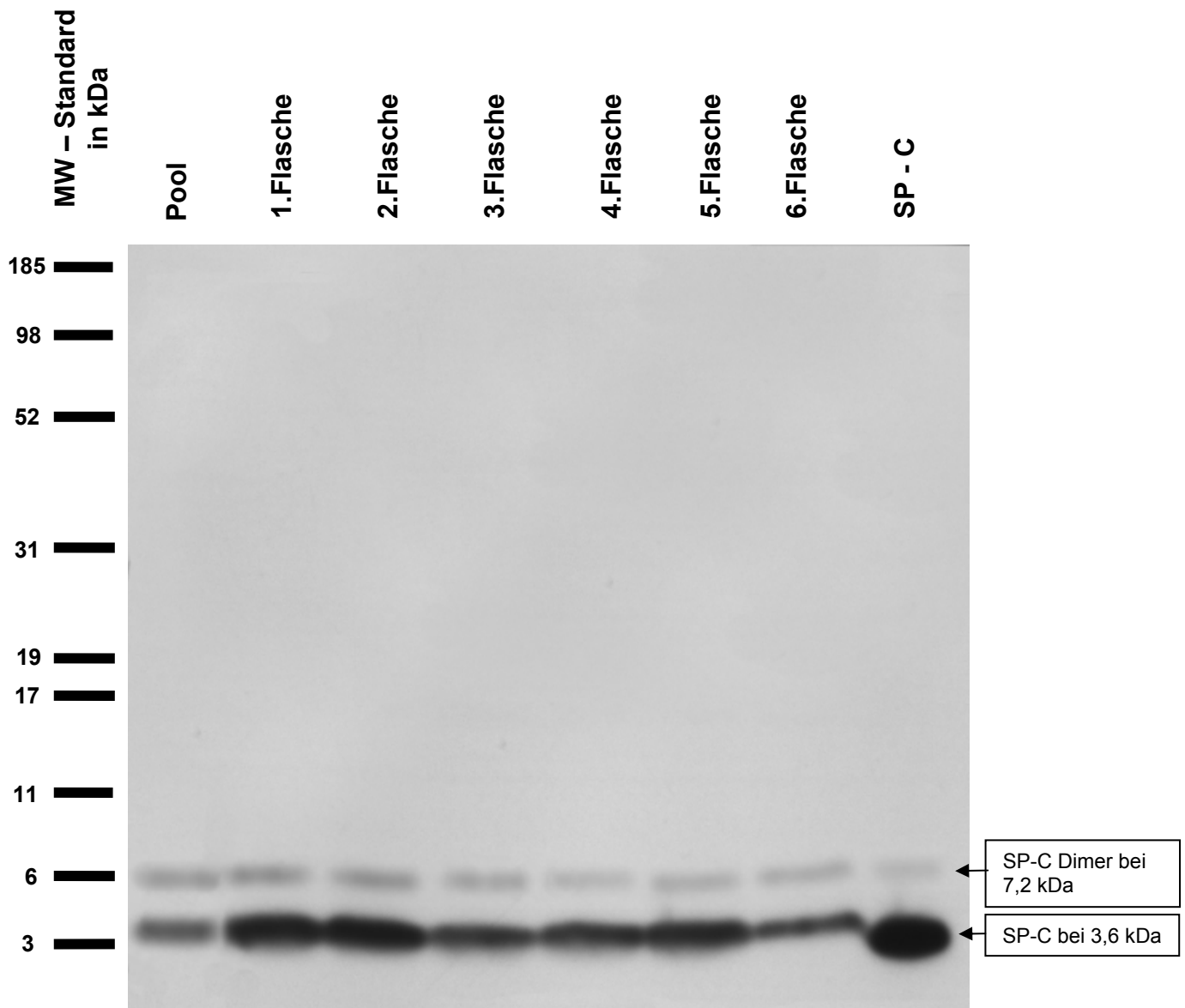


Abb.II.A.2.5.2.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden nicht vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Das nicht reduzierte Gel ergibt ebenfalls eine gleichmäßige Auswaschkinetik, jedoch ist zusätzlich noch die dimere Form zu erkennen, da die intermolekularen Disulfidbrücken nicht gespalten wurden.

III.A.2.6. Pro SP-C mittels 1D Gelelektrophorese und Immunoblot bei Patient J01

III.A.2.6.1. Reduzierte Form

Das Verhalten des pro SP-C des Patienten J01 während einer Lavage wurde durch eine eindimensionale Auftrennung des Pools und aller Flaschen der Ganzlungenlavage von J01 vom 5.6.00 dargestellt.

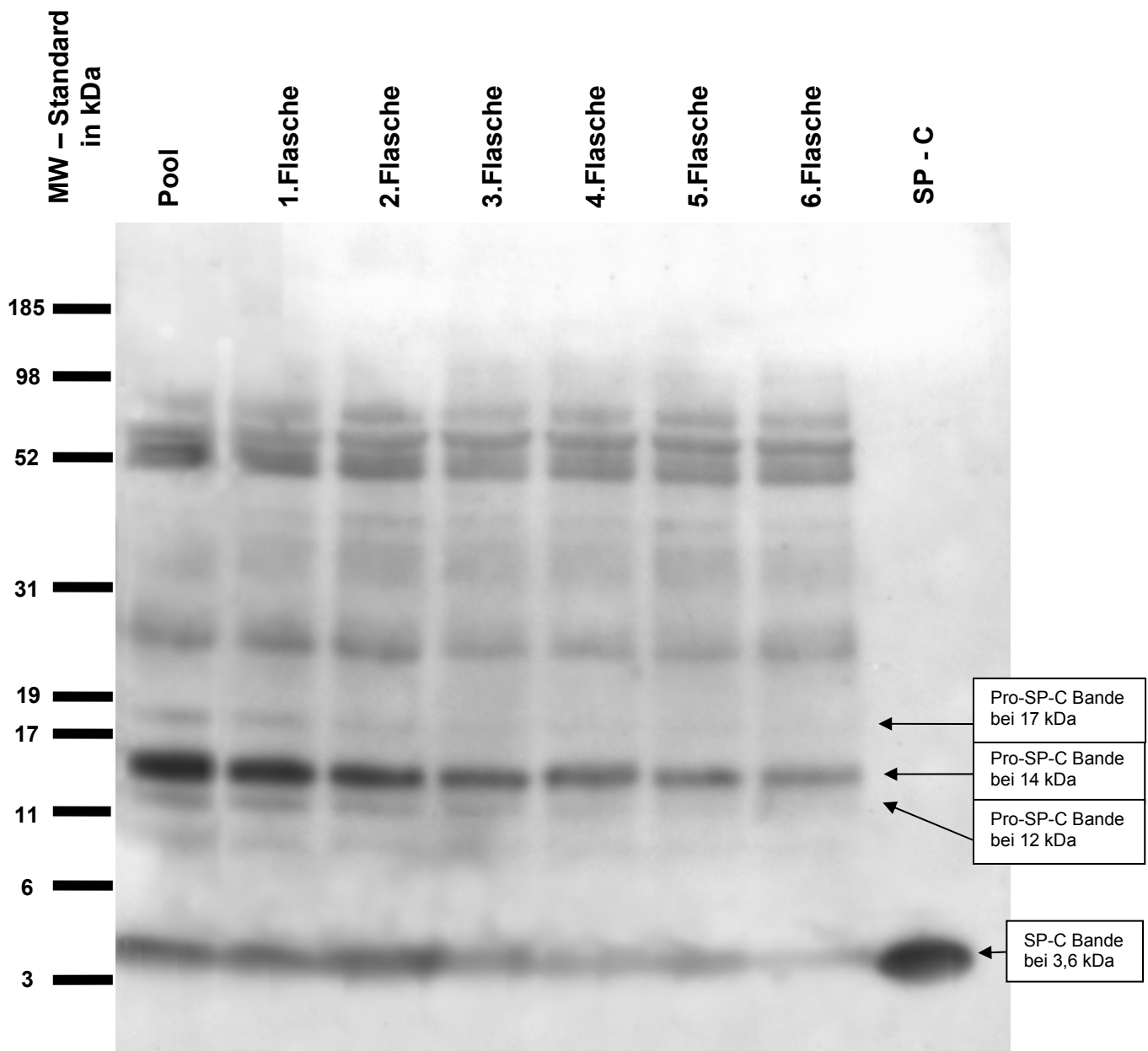


Abb.III.A.2.6.1.1.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Es lässt sich eine gleichmäßige Auswaschkinetik der Proformen des SP-C des Patienten J01 erkennen.

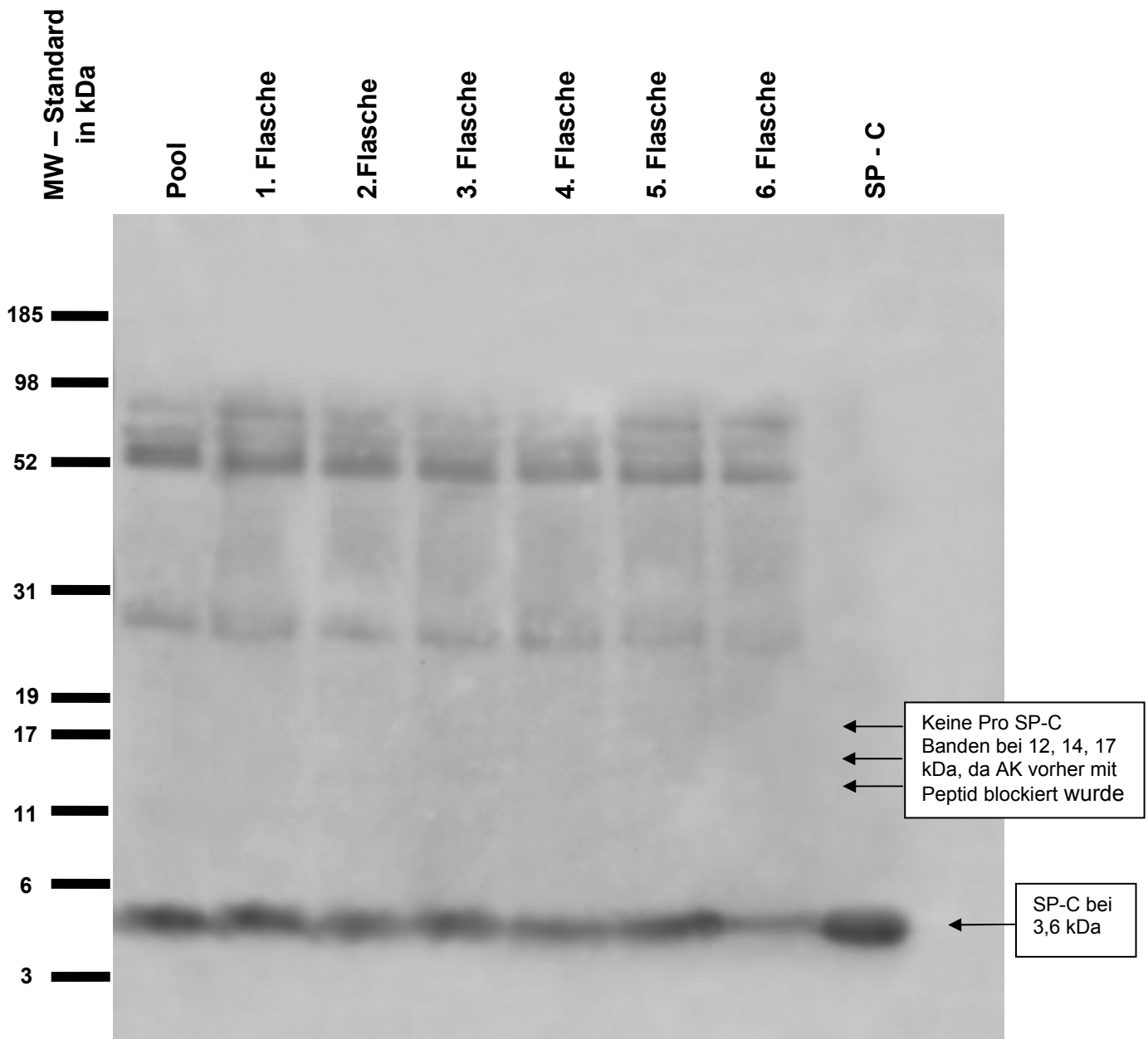


Abb.III.A.2.6.1.2.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper plus Peptid inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Es erfolgte eine Inkubation mit dem NPROSP-C-C2 Antikörper, der vorher spezifisch mit Peptid blockiert wurde. Es zeigen sich keine Banden, d.h. die Banden in Abbildung III.A.2.6.1.1. sind somit spezifische pro-C Banden.

III.A.2.6.2. Nicht - reduzierte Form

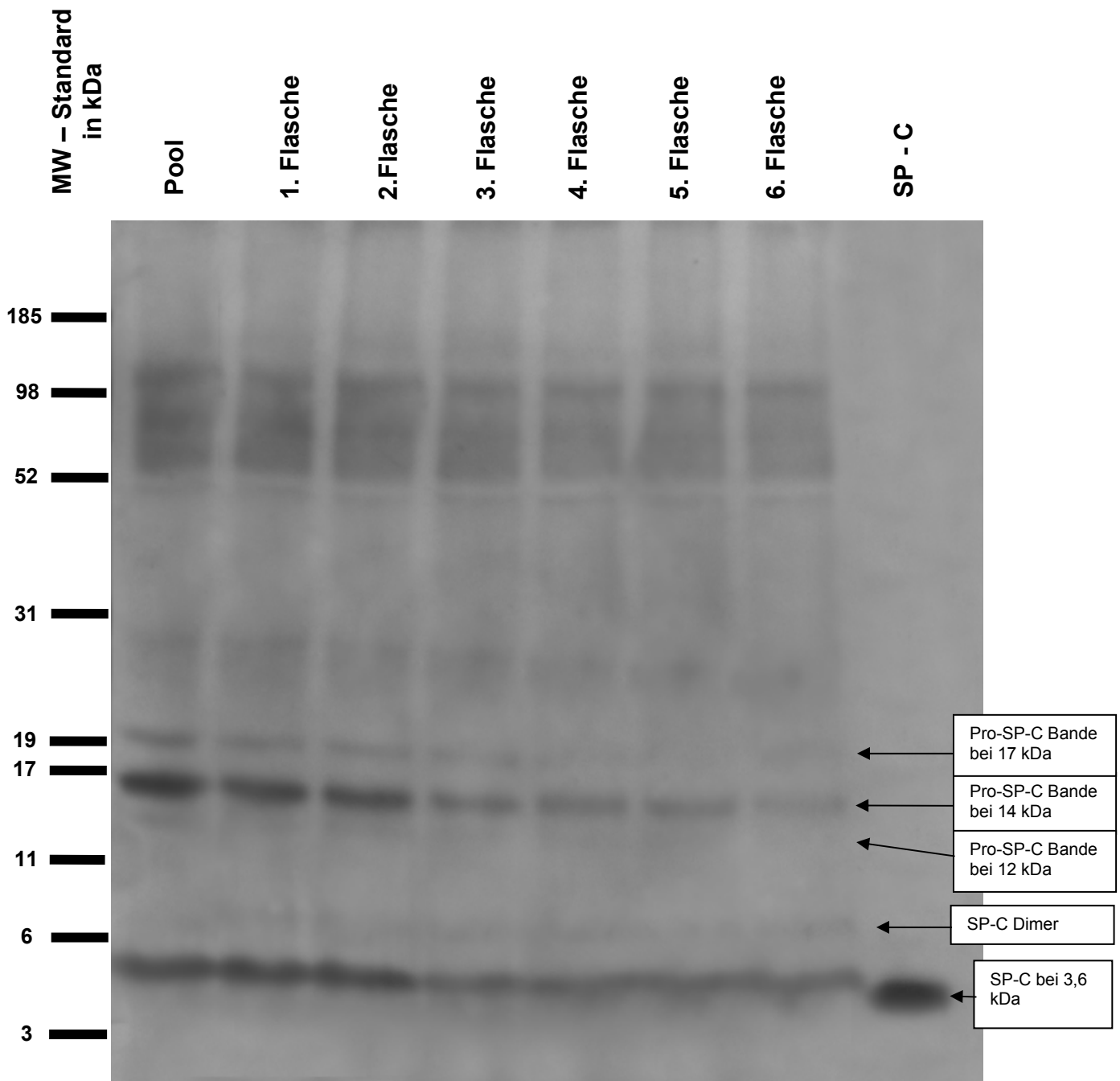


Abb.III.A.2.6.2.1.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden nicht reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Auch in der nicht – reduzierten Form lässt sich eine gleichmäßige Auswaschkinetik der Proformen des SP-C des Patienten J01 erkennen.

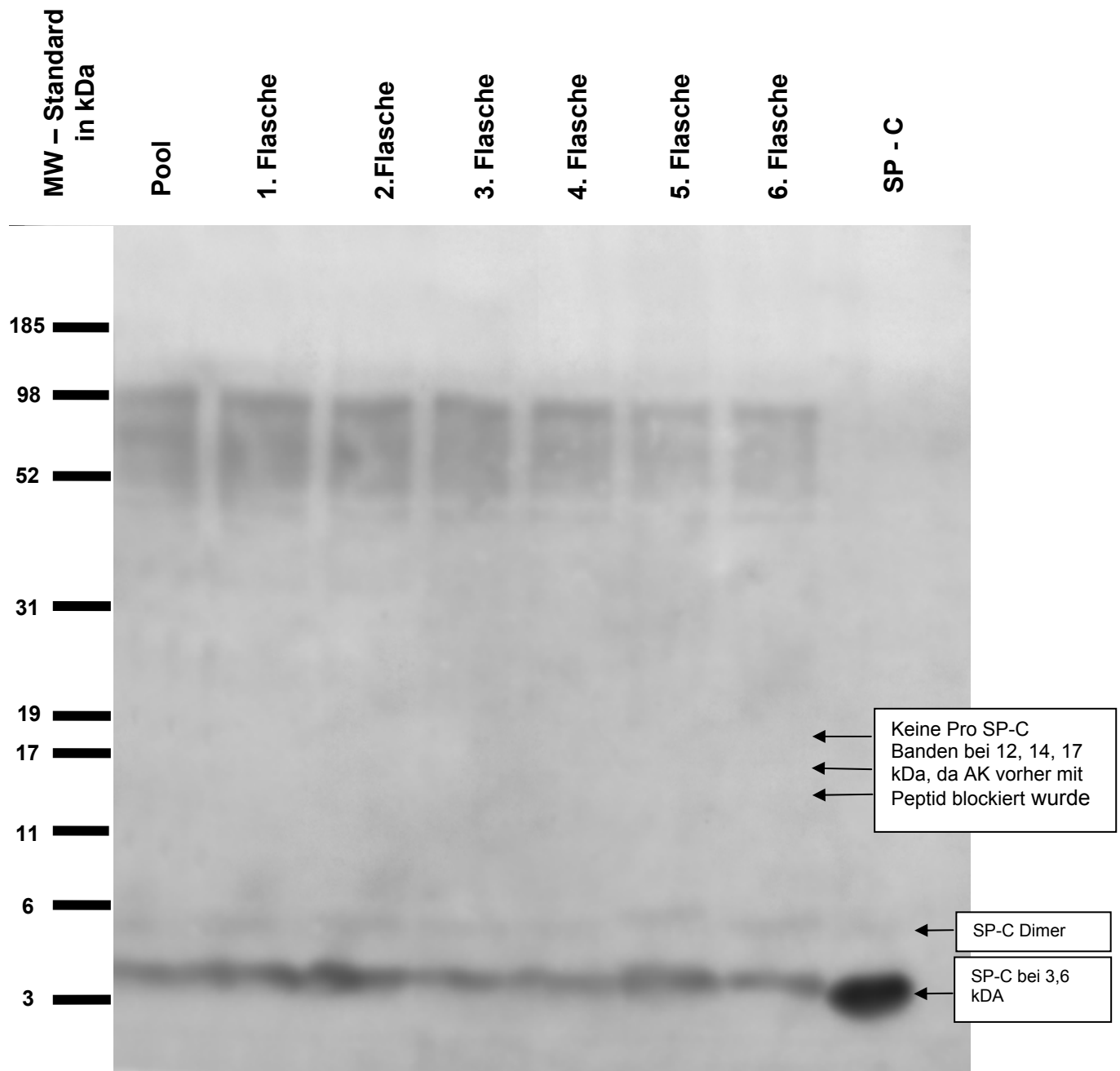


Abb:III.A.2.6.2.2.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools und der 6 Flaschen der J01 Lavage vom 5.6.00 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher nicht reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper plus Peptid inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Es erfolgte eine Inkubation mit dem NPROSP-C-C2 Antikörper, der vorher spezifisch mit Peptid blockiert wurde. Es zeigten sich keine Banden, d.h. die Banden in Abbildung III.A.2.6.2.2. sind somit spezifische pro-C Banden.

III.A.2.7. Gesamtauswaschcharakteristik mittels 2D Gelelektrophorese über Silberfärbung

III.A.2.7.1. Patient J01

Um zu erkennen, ob und in welchem Ausmaß sich die Konzentration der einzelnen Proteine im Laufe einer BAL verändert, wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein der einzelnen Flaschen der BAL vom 16.4.2003 des Patienten J01 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Vergleich wurden 80 µg Gesamtprotein des Serums des gleichen Tages durch 2D Gelelektrophorese aufgetrennt.

Serum

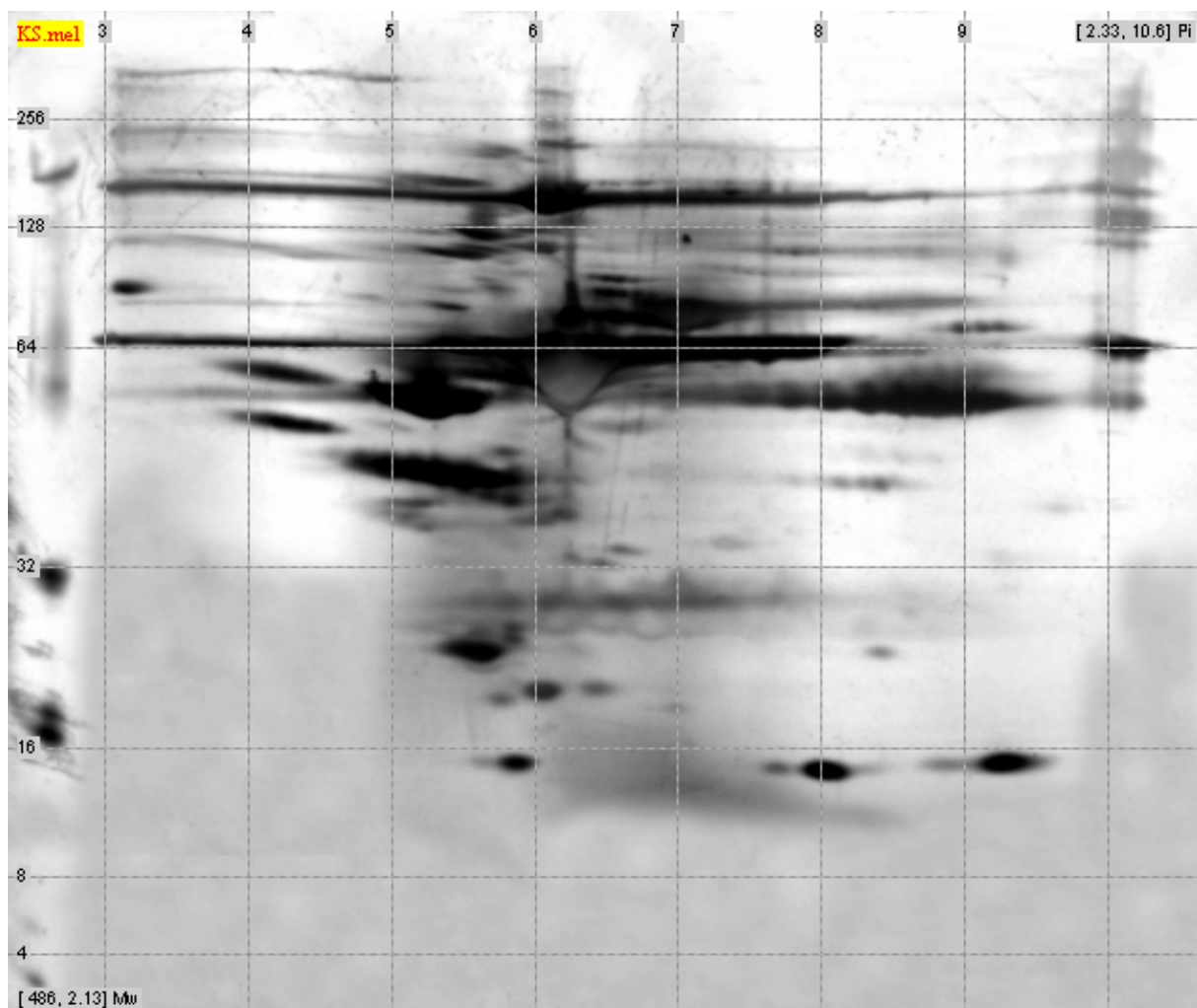


Abb.III.A.2.7.1.1.: Auftrennung von 80 µg Serumprotein des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Pool

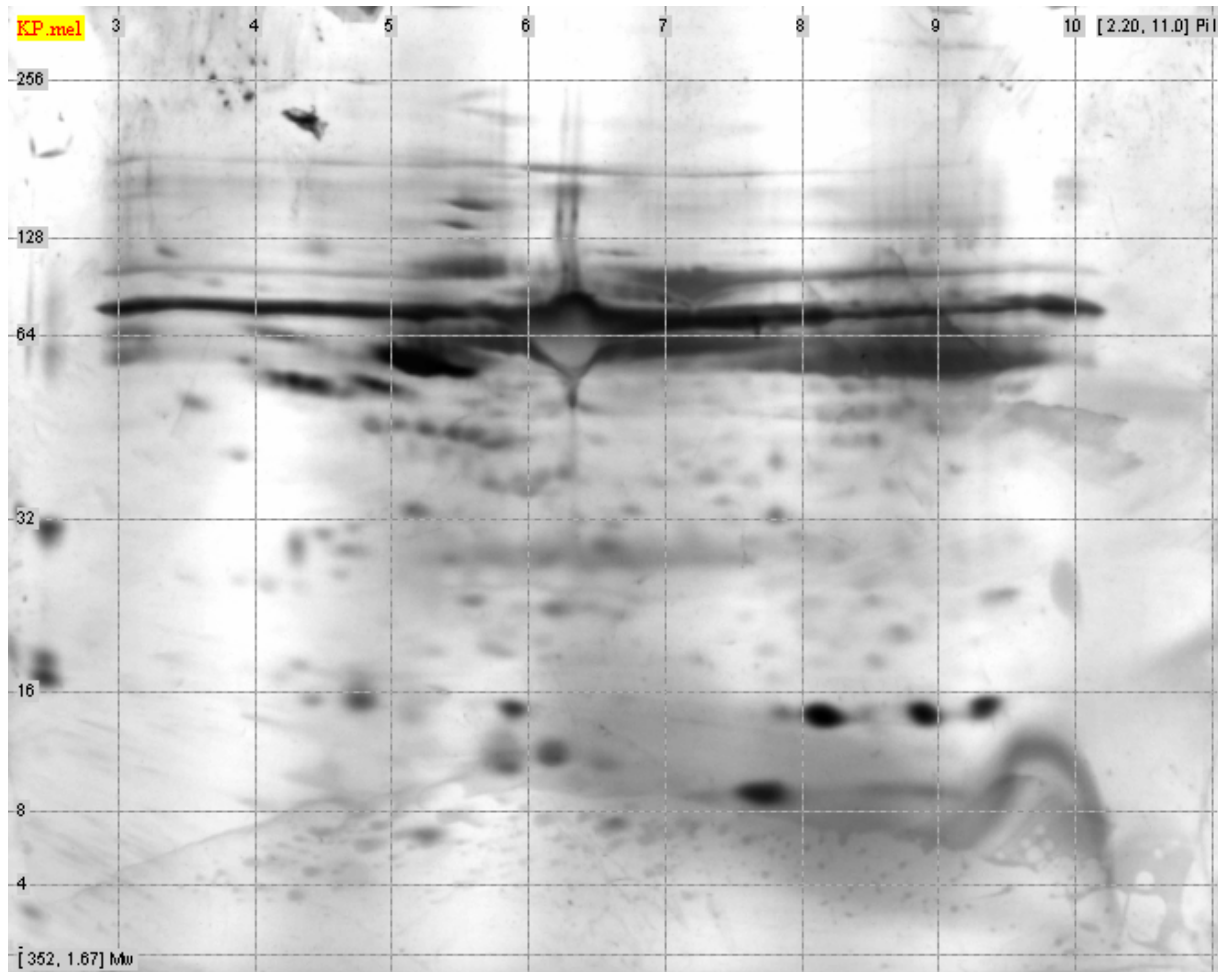


Abb.III.A.2.7.1.2.: Auftrennung von 80 μ g Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

1.Flasche

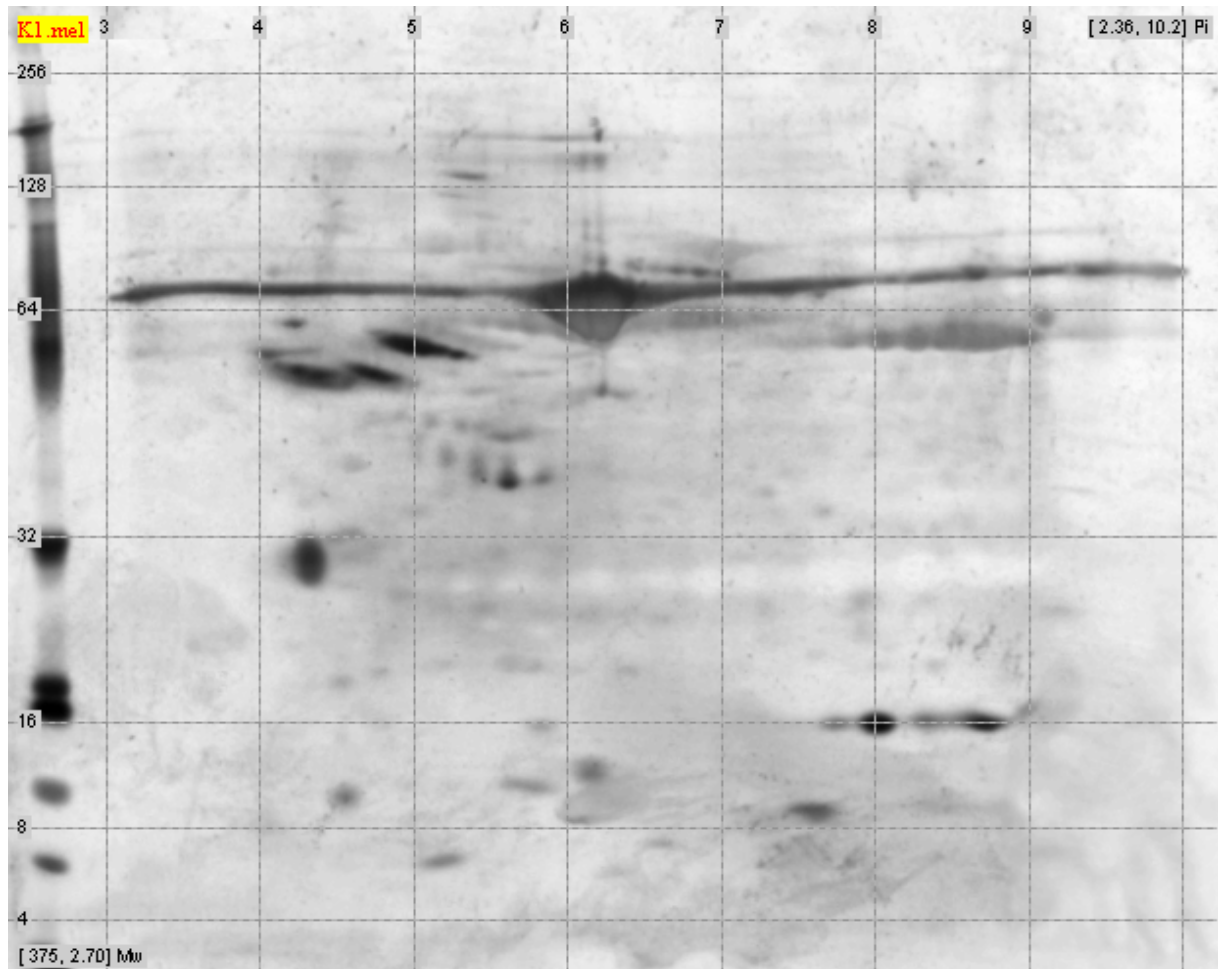


Abb.III.A.2.7.1.3.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 1. Flasche des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

2. Flasche

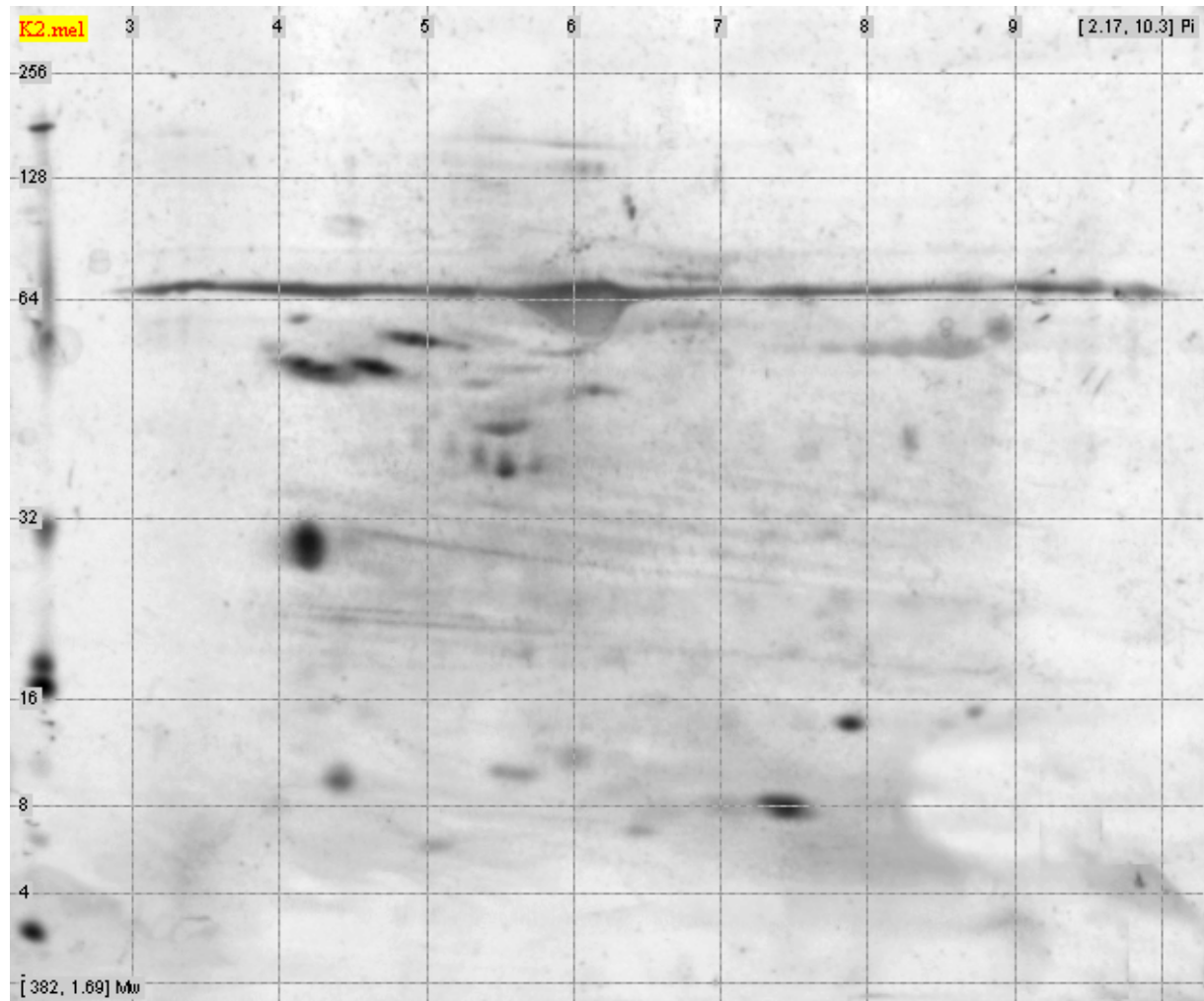


Abb.III.A.2.7.1.4.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 2. Flasche des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

3. Flasche

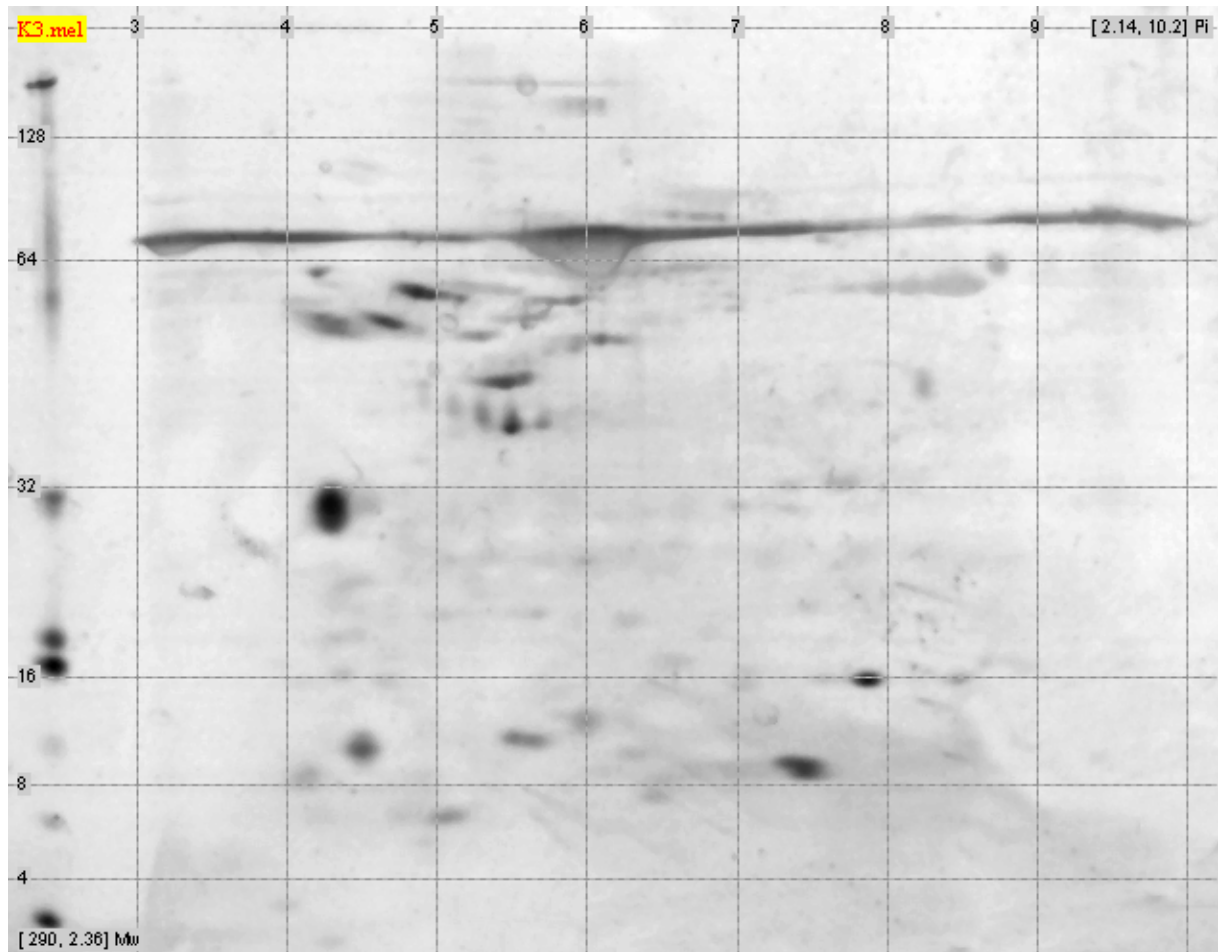


Abb.III.A.2.7.1.5.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 3. Flasche des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

4. Flasche

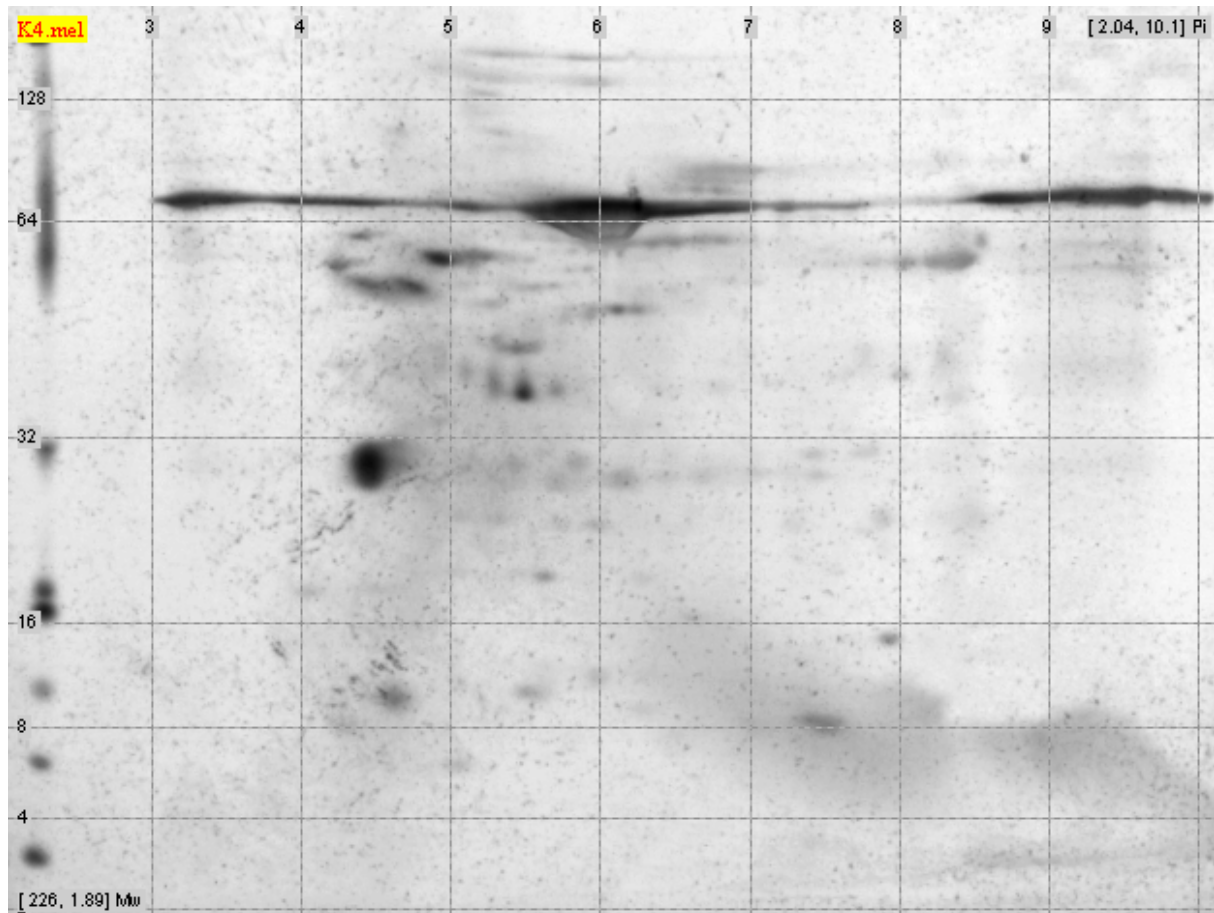


Abb.III.A.2.7.1.6.: Auftrennung von 80 μ g Gesamtprotein der 4. Flasche des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Das Muster der 2D Gelelektrophorese der Lavage ist ähnlich dem des Musters des Serums mit Ausnahme der hochmolekularen Spots über 128 kDa. Während des Lavageprozesses verschwinden einige Spots, aber das allgemeine Muster bleibt gleich. Eine Veränderung der Intensität einzelner Proteinspots ist auf den Gelen gut zu erkennen. Daraufhin wurde für jedes identifizierte Protein die Intensitätsveränderung im Laufe der Lavage dargestellt. Die Intensität der einzelnen Spots wurde visuell auf einer Skala von 0 bis 5 beurteilt, wobei 5 die höchste Intensität und 0 die geringste Intensität bedeutete.

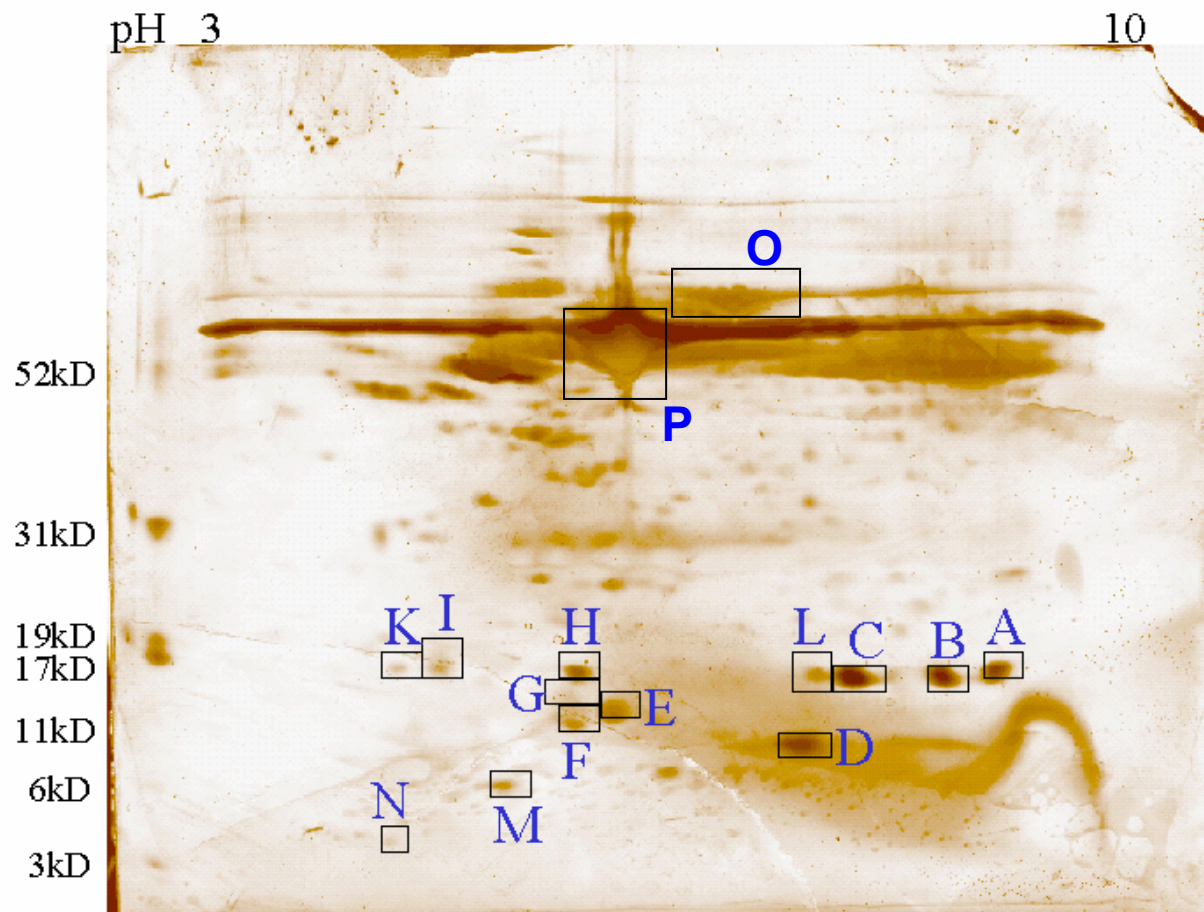


Abb.III.A.2.7.1.7.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 16.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Spot A:	Alphakette Hämoglobin
Spot B:	Alphakette Hämoglobin
Spot C:	Betakette Hämoglobin
Spot D:	Calgranulin A
Spot E:	Calgranulin B
Spot F:	Calgranulin B
Spot G:	nicht identifizierbar
Spot H:	Transthyretin Präcurser
Spot I:	nicht identifizierbar
Spot K:	nicht identifizierbar
Spot L:	nicht identifizierbar
Spot M:	nicht identifizierbar
Spot N:	Clara Zellen Phospholipid bindendes Protein Präcurser
Spot O:	Transferrin
Spot P:	Albumin

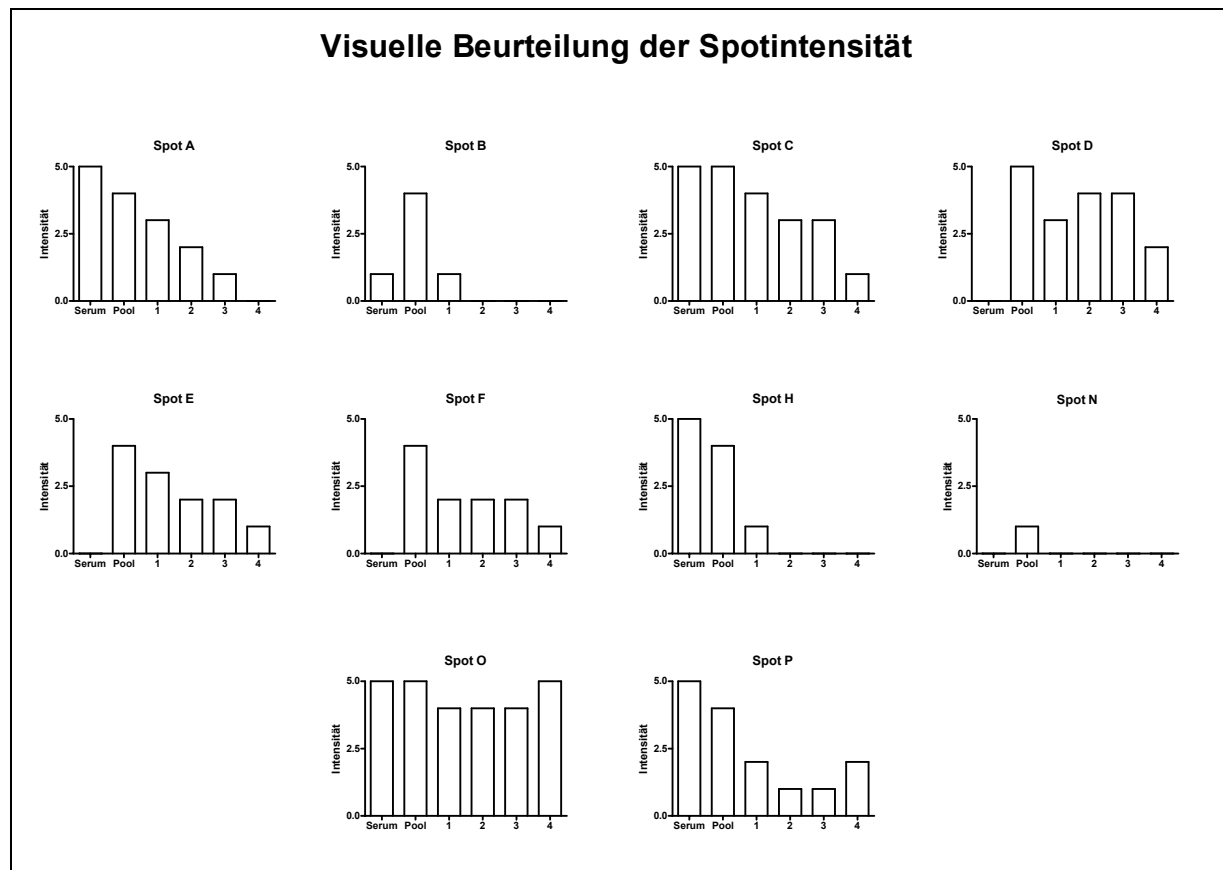


Abb.III.A.2.7.1.8.: Darstellung der Spotintensität nach visueller Beurteilung.

Anhand der erstellten Intensitätsgraphen lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Die Spots A, B und C (Hämoglobin) sind sowohl im Serum als auch in der BAL vorhanden und ihre Intensität nimmt im Laufe der Lavage kontinuierlich ab.
- Die Spots D, E und F (Calgranulin) sind nur in der BAL und nicht im Serum vorhanden und ihre Intensität verringert sich im Laufe der Lavage.
- Der Spot H (Transthyrethin Präcurser) ist im Serum und in der BAL vorhanden und seine Konzentration nimmt im Verlauf ab, ab Flasche 2 ist visuell kein Spot mehr zu erkennen.
- Der Spot N (Clara Zellen Phospholipid bindendes Protein Präcurser) ist im Serum nicht zu erkennen, sondern nur im Pool der BAL.
- Der Spot O (Albumin) ist in unveränderlicher Intensität sowohl im Serum als auch in der BAL zu erkennen.
- Der Spot P (Transferrin) liegt im Serum und in der BAL vor, seine Intensität verringert sich im Laufe der Lavage.

III.A.2.7.2. Patient J02

Um zu erkennen, ob und in welchem Ausmaß sich die Konzentration der einzelnen Proteine im Laufe einer BAL verändert, wurden jeweils 80 µg Gesamtprotein der einzelnen Flaschen der BAL vom 25.4.2003 des Patienten J02 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Vergleich wurden 80 µg Gesamtprotein des Serums des gleichen Tages durch 2D Gelelektrophorese aufgetrennt.

Serum

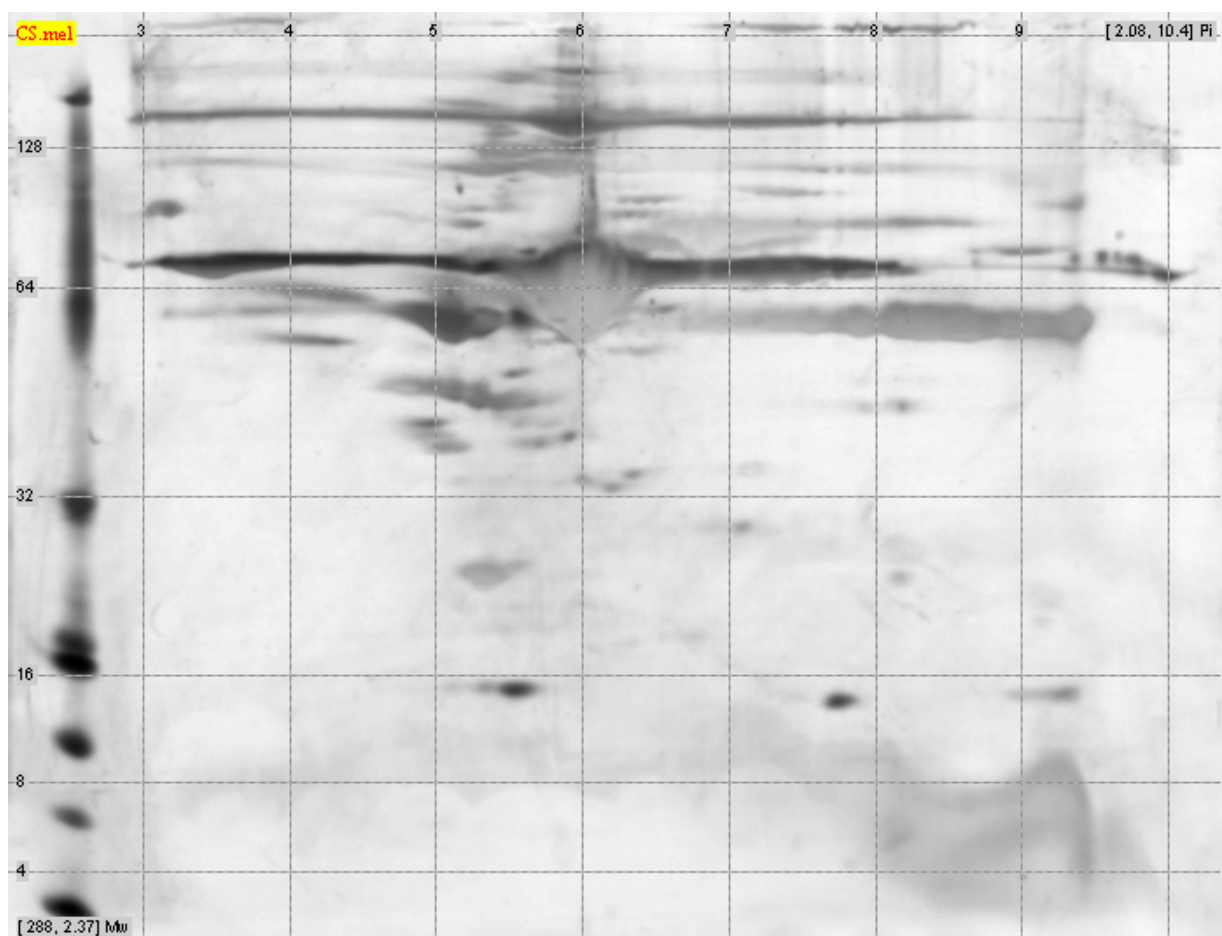


Abb.III.A.2.7.2.1.: Auftrennung von 80 µg Serumprotein des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Pool

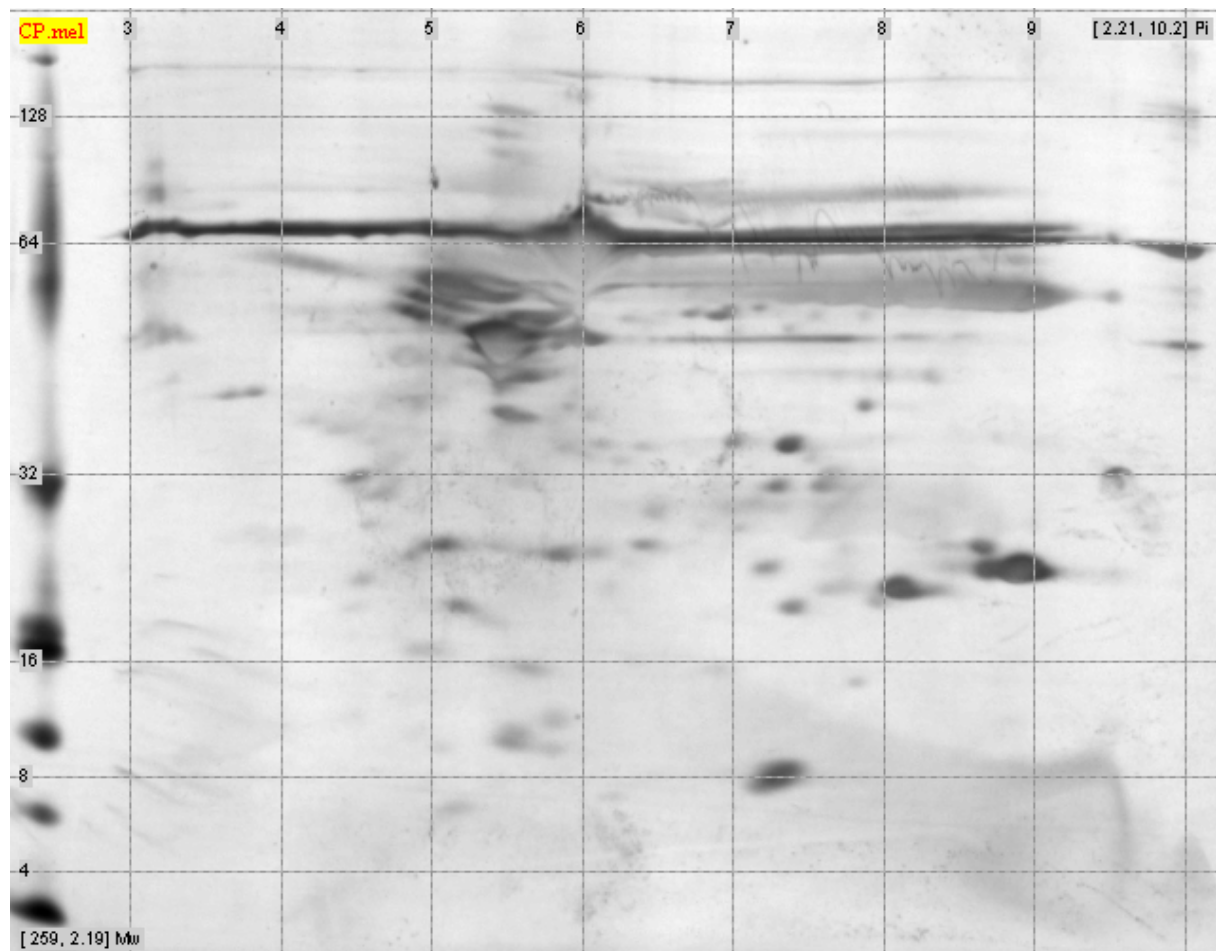


Abb.III.A.2.7.2.2.: Auftrennung von 80 μ g Gesamtprotein des Pools des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

1.Flasche

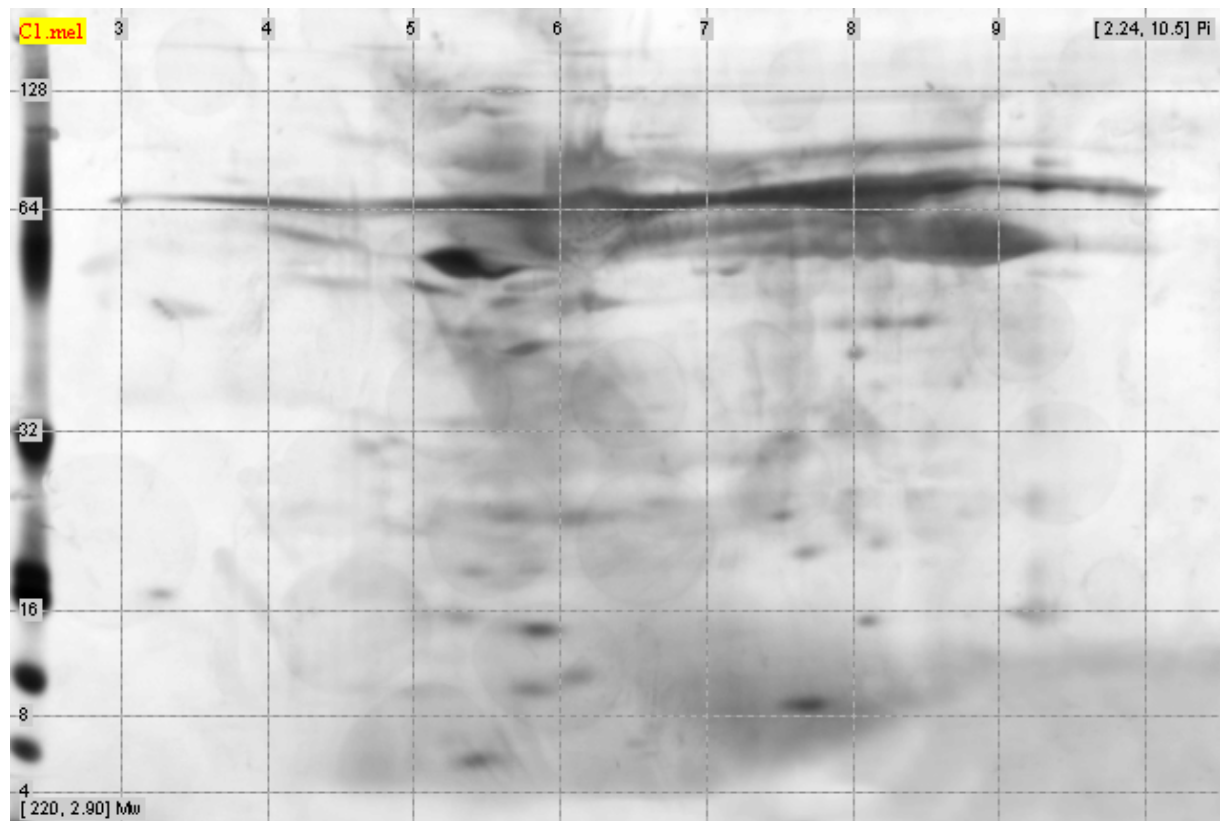


Abb.III.A.2.7.2.3.: Auftrennung von 80 μ g Gesamtprotein der 1. Flasche des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

2. Flasche

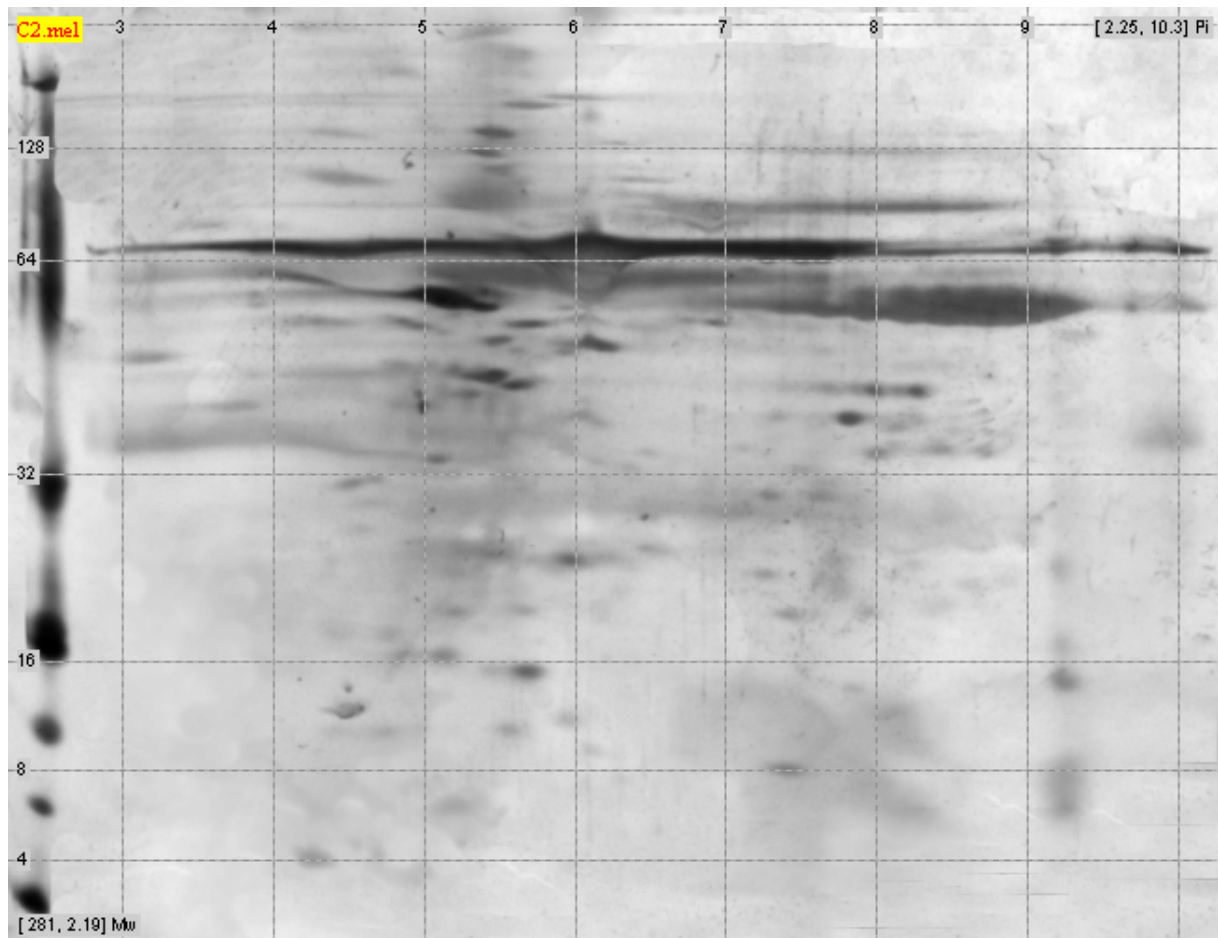


Abb.III.A.2.7.2.4.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 2. Flasche des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

3. Flasche

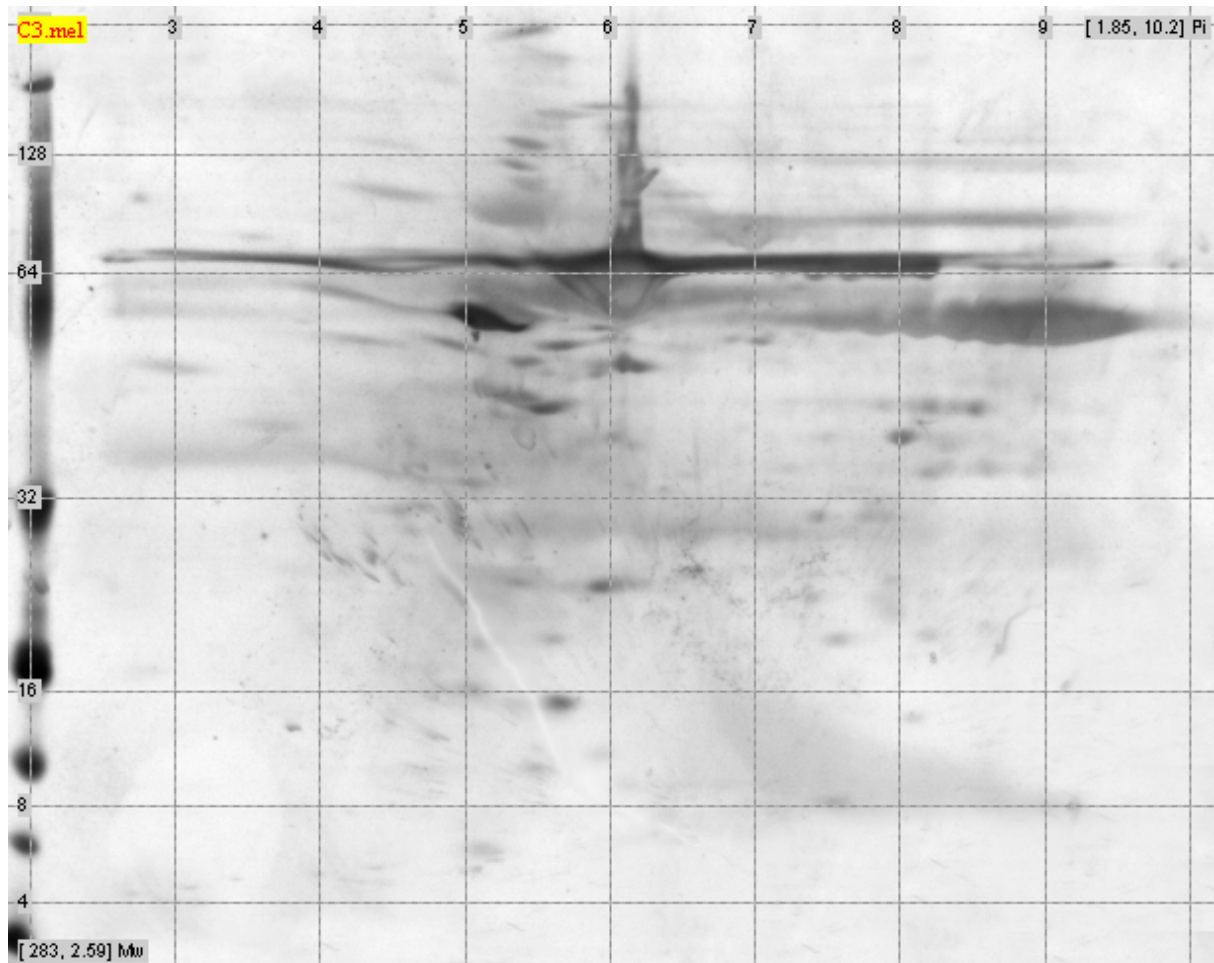


Abb.III.A.2.7.2.5.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 3. Flasche des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

4. Flasche

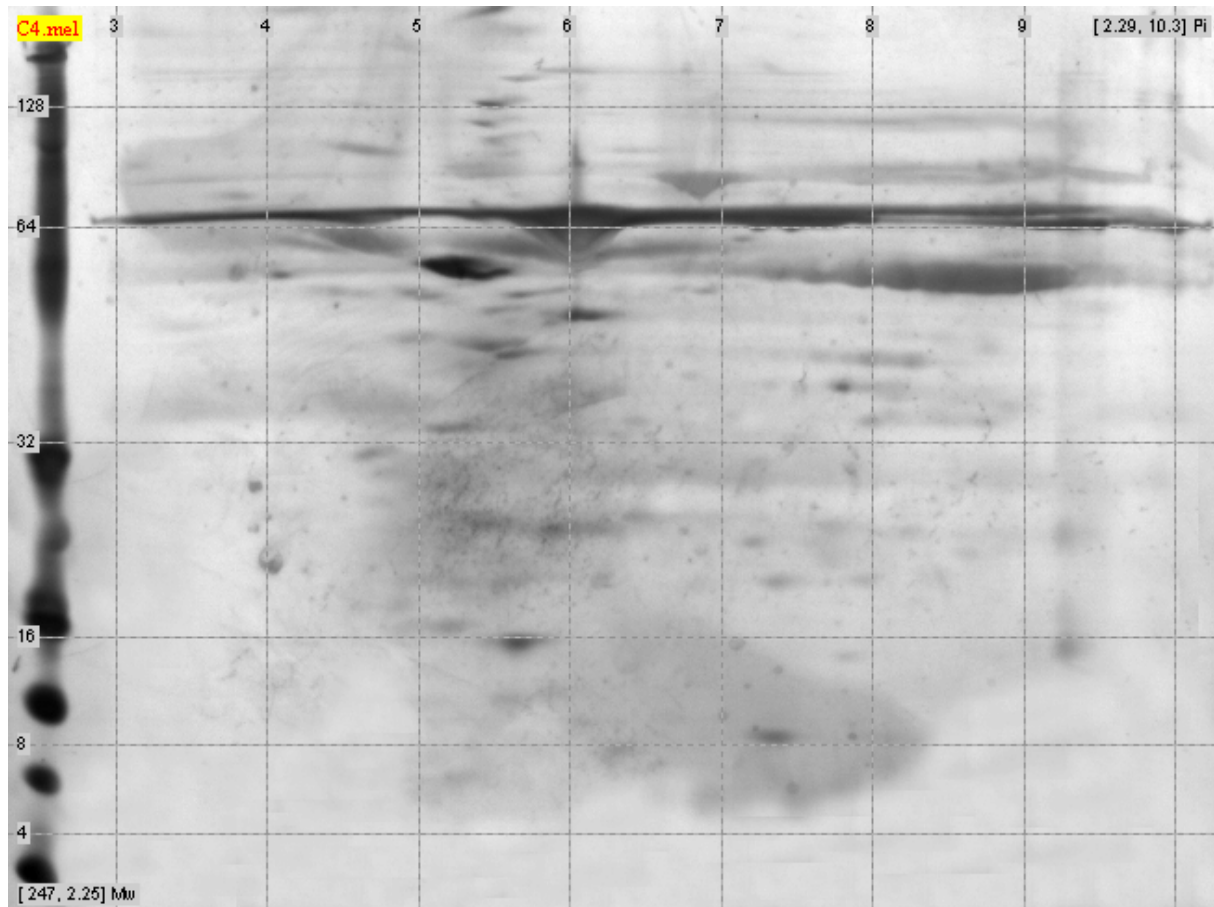


Abb.III.A.2.7.2.6.: Auftrennung von 80 μg Gesamtprotein der 4. Flasche des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

5. Flasche

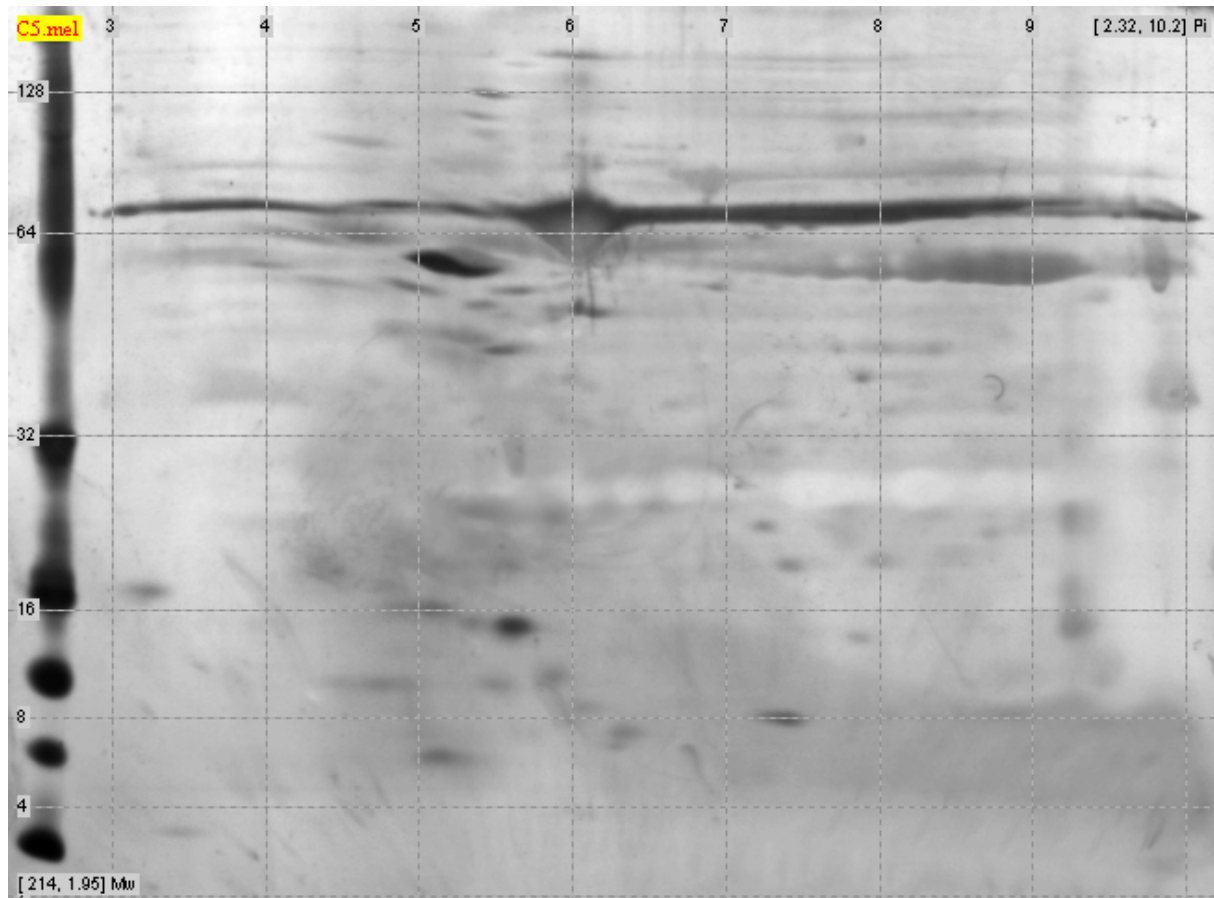


Abb.III.A.2.7.2.7.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein der 5. Flasche des Patienten J02 vom 25.4.2003 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Anschließend wurde das Gel nach der Methode von Heukeshoven silbergefärbt. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Das Muster der 2D Gelelektrophorese der Lavage ist ähnlich dem des Musters des Serums mit Ausnahme der hochmolekularen Spots über 128 kDa. Während des Lavageprozesses verschwinden einige Spots, aber das allgemeine Muster bleibt gleich. Eine Veränderung der Intensität einzelner Proteinspots ist auf den Gelen gut zu erkennen.

III.B. Halblungenlavagen bei Perfluorcarboneinspülung

III.B.1. Gesamtgehaltsanalyse

III.B.1.1. Protein

III.B.1.1.1. Konzentration

Bei dem Patienten J02 wurde bei 3 aufeinanderfolgenden Halblungenlavagen im Sinne eines Heilversuches untersucht, ob eine Einspülung von Perfluorcarbon eine positive Auswirkung auf die Auswascheffizienz hat. In der Literatur ist beschrieben worden, dass durch das höhere spezifische Gewicht von PFC Ablagerungen in tieferen Kompartimenten der Lunge besser herausgespült werden. Bei dem Patienten J02 wurde einmal nach der 6., ein anderes Mal nach der 7. und ein weiteres Mal nach der 8. Spülportion jeweils 100 ml PFC in die Lunge eingespült und anschließend mit der Lavage fortgefahren. Um die Veränderung der Ausspüleeffizienz beurteilen zu können, wurde zunächst die mittlere Proteinkonzentration von 2 Spülflaschen vor und 4 Spülflaschen nach der PFC Einspülung miteinander verglichen.

Proteinkonzentration (µg/ml)	Portionen 5-6 (n=12)	Portionen 7-10 (n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	303,9	200,6	100,0	66,0
BAL mit PFC Einspülung zwischen 6. und 7. Spülportion	647,4	413,0	100,0	63,8
	Portionen 6-7 (n=10)	Portionen 8-11 (n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	218,2	191,9	100,0	87,9
BAL mit PFC Einspülung zwischen 7. und 8. Spülportion	479,6	383,6	100,0	80,0
	Portionen 7-8 (n=8)	Portionen 9-12 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	209,0	157,6	100,0	75,4
BAL mit PFC Einspülung zwischen 8. und 9. Spülportion	172,7	221,9	100,0	128,5

III.B.1.1.1.1.: Mittlere Proteinkonzentrationen jeweils 2 Flaschen vor und 4 Flaschen nach dem jeweiligen Zeitpunkt der PFC Einspülung. Die Proteinkonzentrationen vor der Einspülung des PFC wurde als 100% festgelegt, um die Veränderung besser beurteilen zu können.

Bei 2 der 3 Halblungenlavagen mit PFC zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Lavagen ohne PFC Einspülung. Bei einer Lavage zeigte sich jedoch eine starke Anhebung der Konzentration in der Flasche nach der PFC Einspülung um 28,5%.

III.B.1.1.2. Gesamtmenge

Des weiteren wurden die Proteingesamtmenngen der Flaschen vor und nach der PFC Einspülung untersucht.

Proteinmenge (µg)	Portion 5-6 (n=12)	Portion 7-10 (n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	132833,9	88517,6	100,0	66,6
BAL mit PFC Einspülung zwischen 6. und 7. Spülportion	219570,5	184072,0	100,0	83,8
	Portion 6-7 (n=10)	Portion 8-11(n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	99514,8	92754,9	100,0	93,2
BAL mit PFC Einspülung zwischen 7. und 8. Spülportion	192499,6	185683,0	100,0	96,5
	Portion 7-8 (n=8)	Portion 9-12 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	90749,9	70766,6	100,0	78,0
BAL mit PFC Einspülung zwischen 8. und 9. Spülportion	102321,8	119919,7	100,0	117,2

III.B.1.1.2.1.: Mittlere Gesamtproteinmenge von jeweils 2 Flaschen vor und 4 Flaschen nach dem jeweiligen Zeitpunkt der PFC Einspülung. Die Gesamtproteinmenge vor der Einspülung des PFC wurde als 100% festgelegt, um die Veränderung besser beurteilen zu können.

Bei 2 der 3 Halblungenlavagen mit PFC zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Lavagen ohne PFC Einspülung. Bei einer Lavage zeigte sich jedoch eine starke Anhebung der Konzentration in der Flasche nach der PFC Einspülung um 17,2%.

III.B.1.2. Phospholipid

III.B.1.2.1. Konzentration

Die Untersuchung der Konzentration der Phospholipide, die lipophilen Bestandteile der Lavage, soll die Veränderung der Auswaschcharakteristik der lipophilen Bestandteile erkennen lassen.

Phospholipidkonzentration (µg/ml)	Portion 5-6 (n=5)	Portion 7-10 (n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	115,0	192,0	100,0	167,0
BAL mit PFC Einspülung zwischen 6. und 7. Spülportion	175,0	44,4	100,0	25,4
	Portion 6-7 (n=4)	Portion 8-11 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	87,5	128,9	100,0	147,3
BAL mit PFC Einspülung zwischen 7. und 8. Spülportion	153,4	162,5	100,0	105,9
	Portion 7-8 (n=3)	Portion 9-12 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	186,1	68,5	100,0	36,8
BAL mit PFC Einspülung zwischen 8. und 9. Spülportion	26,2	34,2	100,0	130,8

III.B.1.2.1.1.: Mittlere Phospholipidkonzentrationen jeweils 2 Flaschen vor und 4 Flaschen nach dem jeweiligen Zeitpunkt der PFC Einspülung. Die Phospholipidkonzentrationen vor der Einspülung des PFC wurde als 100% festgelegt, um die Veränderung besser beurteilen zu können.

Bei 2 der 3 Halblungenlavagen mit PFC zeigten die Spülportionen nach der PFC Einspülung stark verringerte Phospholipidkonzentrationen, einmal 40% und einmal sogar 140% weniger als ohne PFC. Nur bei einer Lavage konnte eine Effizienzsteigerung der Auswaschung mit PFC gezeigt werden. In diesem Fall wurde durch PFC die ausgespülte Phospholipidkonzentration im Vergleich zu der durchschnittlich ohne PFC ausgespülten Phospholipidmenge um 100% gesteigert.

III.B.1.2.2. Gesamtmenge

Des weiteren wurden die Phospholipidgestammungen der Flaschen vor und nach der PFC Einspülung untersucht.

Phospholipidgestammung (µg)	Portion 5-6 (n=5)	Portion 7-10 (n=3)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	44712,1	81223,2	100,0	181,7
BAL mit PFC Einspülung zwischen 6. und 7. Spülportion	56600,0	18751,5	100,0	33,1
	Portion 6-7 (n=4)	Portion 8-11 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	36609,6	76435,8	100,0	208,8
BAL mit PFC Einspülung zwischen 7. und 8. Spülportion	51653,8	78008,7	100,0	151,0
	Portion 7-8 (n=3)	Portion 9-12 (n=1)	% vor PFC	% nach PFC
BALs ohne PFC	104032,3	41197,8	100,0	39,6
BAL mit PFC Einspülung zwischen 8. und 9. Spülportion	15511,3	18797,4	100,0	121,2

III.B.1.2.2.1.: Mittlere Phospholipidkonzentrationen jeweils 2 Flaschen vor und 4 Flaschen nach dem jeweiligen Zeitpunkt der PFC Einspülung. Die Phospholipidkonzentrationen vor der Einspülung des PFC wurde als 100% festgelegt, um die Veränderung besser beurteilen zu können.

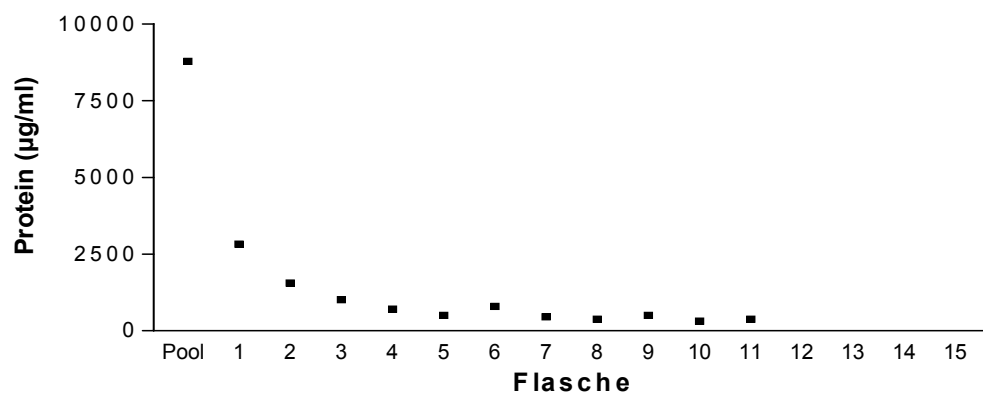
Bei 2 der 3 Halblungenlavagen mit PFC, zeigten die Spülportionen nach der PFC Einspülung stark verringerte Phospholipidmengen in den Spülflaschen, einmal 50% und einmal sogar 150% weniger als ohne PFC. Nur bei einer Lavage konnte eine Effizienzsteigerung der Auswaschung mit PFC gezeigt werden. In diesem Fall wurde durch PFC die ausgespülte Gesamtphospholipidmenge in den Flaschen um 21,2% gesteigert.

III.B.2. Auswaschkinetik

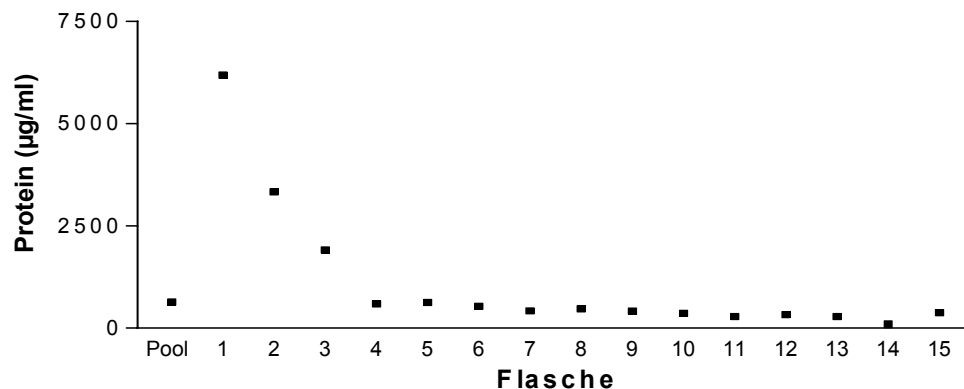
III.B.2.1. Protein

III.B.2.1.1. Konzentration

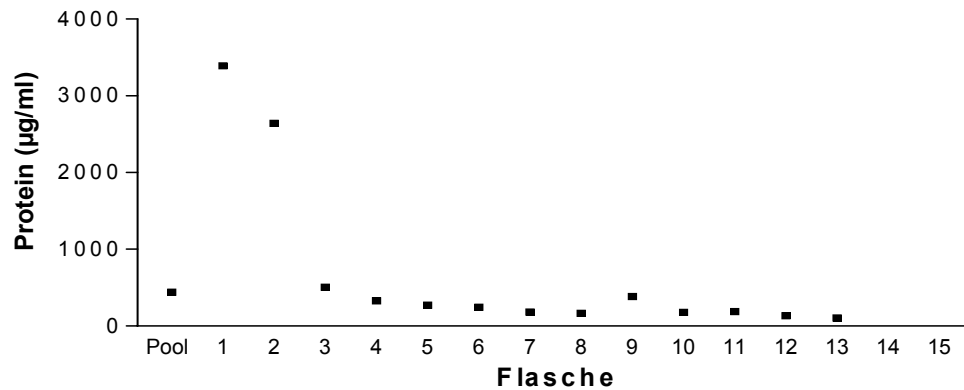
Um eventuelle Veränderungen durch PFC in der Auswaschkinetik erkennen zu können, wurden die Proteinkonzentration der 3 Halblungenlavagen mit PFC Einspülung dargestellt.



III.B.2.1.1.1.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.1.1.2.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

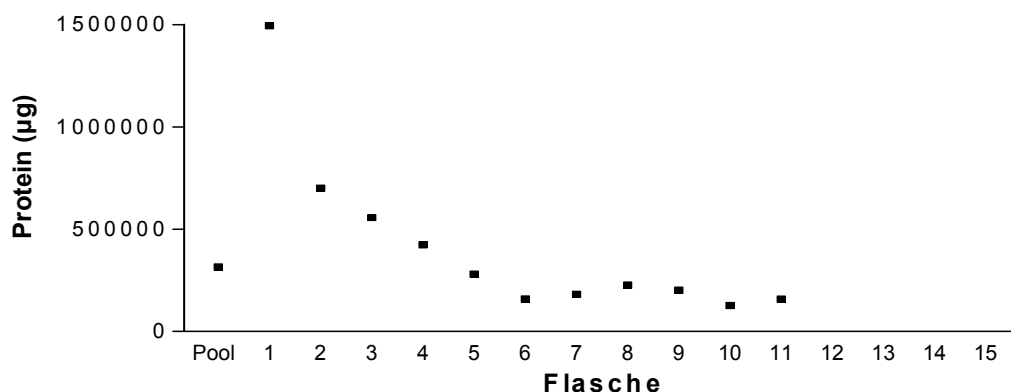


III.B.2.1.1.3.: Proteinkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

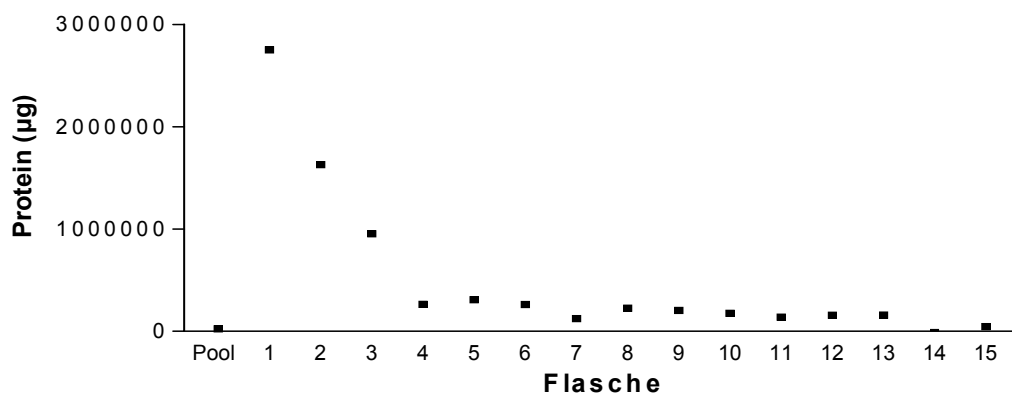
Bei den beiden letzten Auswaschkinetiken lässt sich ein leichter Anstieg der Proteinkonzentration nach der PFC Einspülung erkennen. Bei der als erstes dargestellten Kinetik ist eine Anhebung vor der Einspülung zu beobachten, welche nicht durch PFC beeinflusst wurde.

III.B.2.1.2. Gesamtmenge je 500 ml Portion

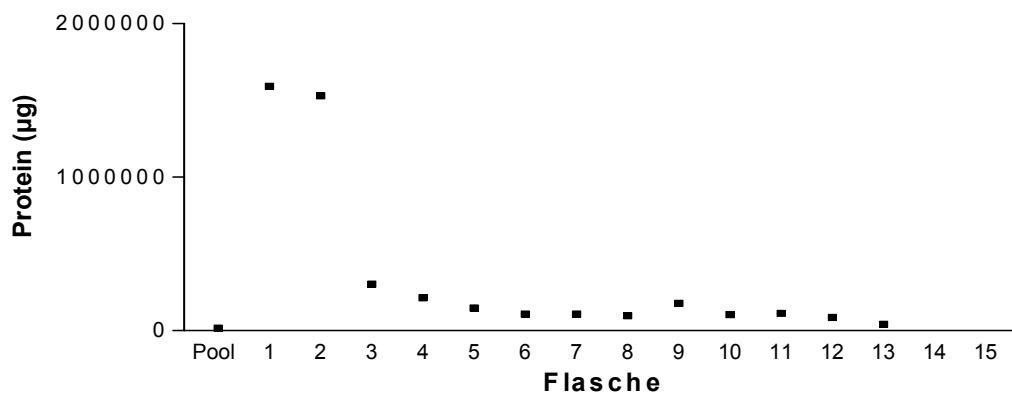
Des weiteren wurde noch die Gesamtmenge an Protein in je 500 ml Portion Spülflüssigkeit untersucht.



III.B.2.1.2.1.: Proteinmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.1.2.2.: Proteinmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

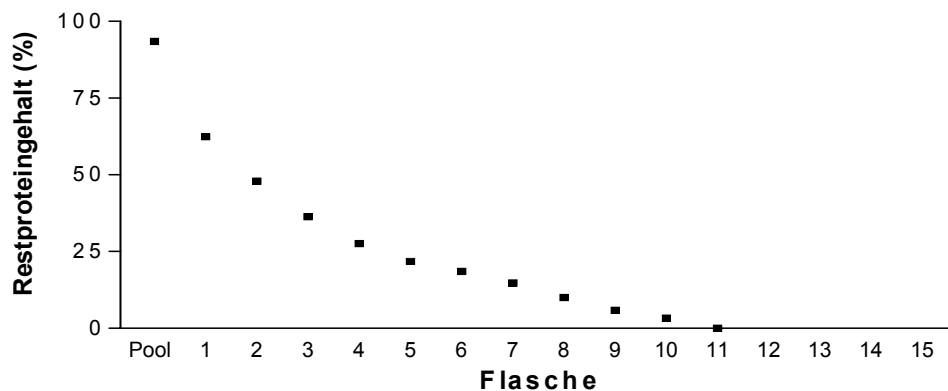


III.B.2.1.2.3.: Proteinmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche. Ein Symbol entspricht der Proteinmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

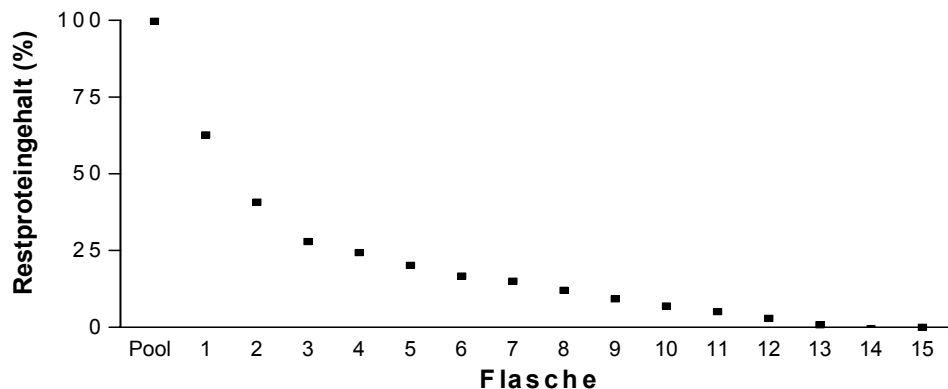
Bei allen Auswaschkinetiken der Gesamtproteinmenge lässt sich ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge in den Spülflaschen nach der PFC Einspülung erkennen.

III.B.2.1.3. Protein % gesamt

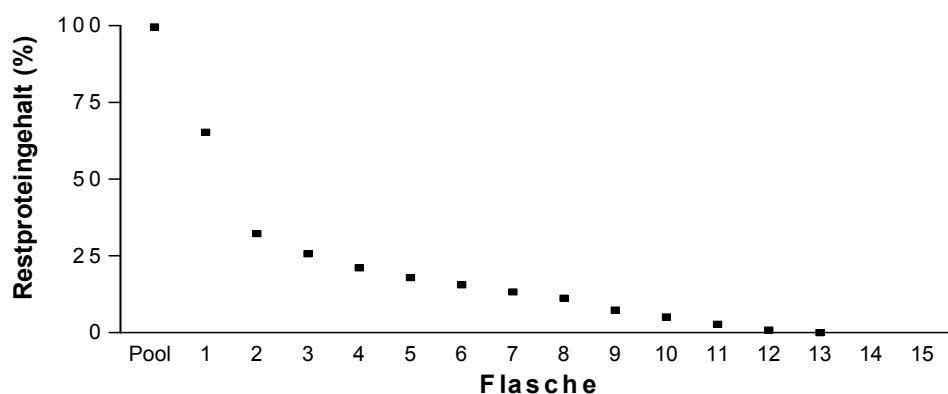
Der Restproteingehalt, welcher nach der jeweiligen Spülportion noch in der Lunge verblieben ist, wurde als nächstes graphisch dargestellt.



III.B.2.1.3.1.: Darstellung des Restproteingehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.1.3.2.: Darstellung des Restproteingehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



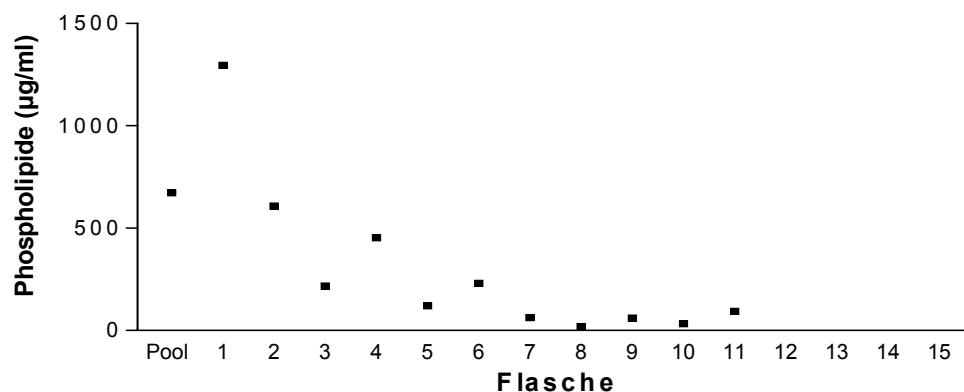
III.B.2.1.3.3.: Darstellung des Restproteingehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtproteinmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Proteinmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Im Bereich der PFC Einspülung lässt sich bei allen 3 Halblungenlavagen eine leichte "Sattelbildung," feststellen. Diese beruht darauf, dass in diesem Bereich die immer darauffolgende Flasche mehr Protein beinhaltet, als wie es für eine gleichmäßig abnehmende Auswaschkinetik nötig wäre.

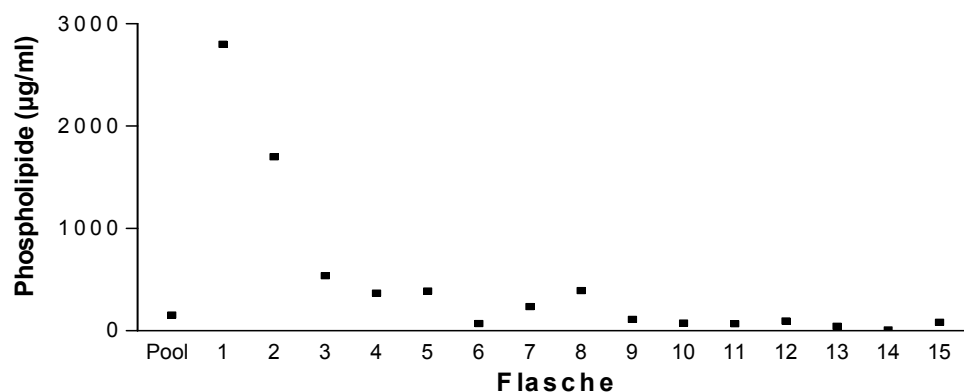
III.B.2.2. Phospholipide

III.B.2.2.1. Konzentration

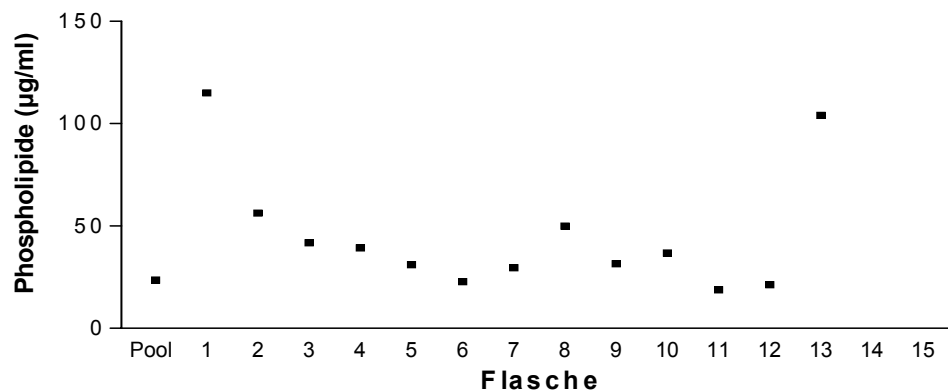
Um auch eventuelle Veränderungen durch PFC in der Auswaschkinetik der lipophilen Bestandteile erkennen zu können, wurden auch die Phospholipidkonzentrationen der 3 Halblungenlavagen mit PFC Einspülung dargestellt.



III.B.2.2.1.1.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.2.1.2.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

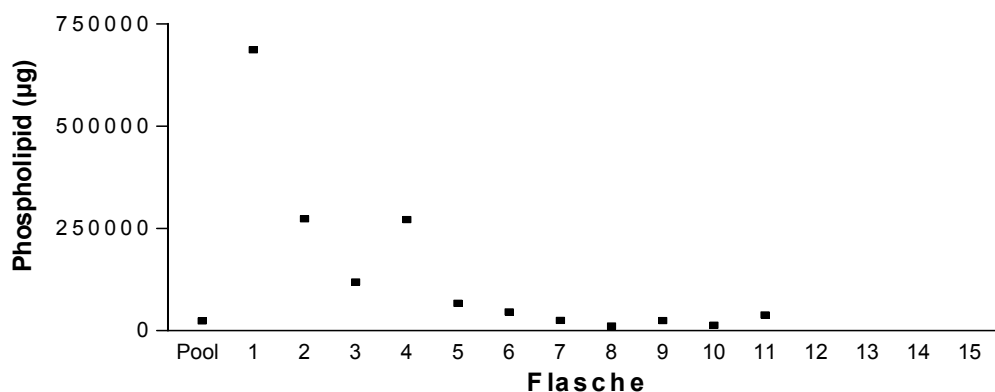


III.B.2.2.1.3.: Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidkonzentration einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg/ml des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

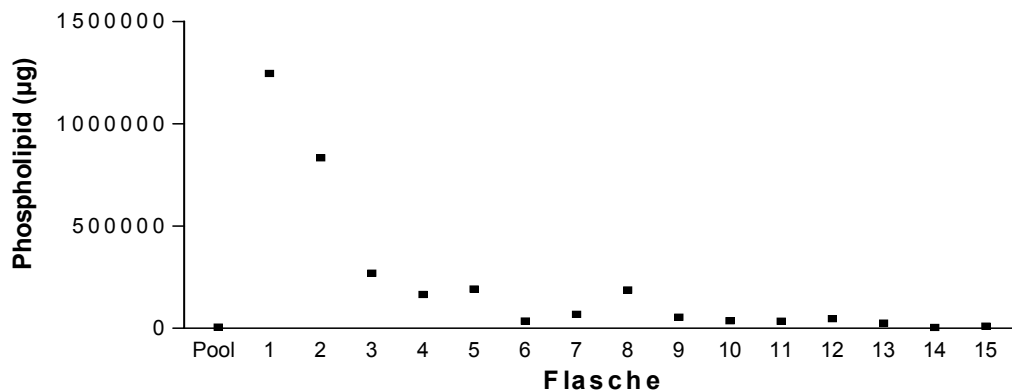
Die Auswaschkinetik der Phospholipide erscheint unregelmäßiger als die Kinetik der Proteinkonzentrationen. Nur bei der als zweites dargestellten Auswaschkinetik lässt sich ein deutlicher Anstieg der Phospholipidkonzentration nach der PFC Einspülung verzeichnen. Die anderen Kinetiken erscheinen von der PFC Einspülung unbeeinträchtigt.

III.B.2.2.2. Gesamtmenge je 500 ml Portion

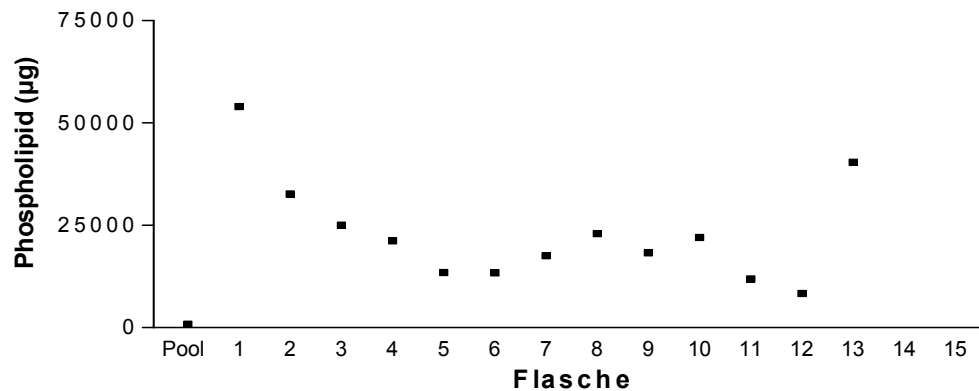
Des weiteren wurde noch die Gesamtmenge an Phospholipid in je 500 ml Portion Spülflüssigkeit untersucht.



III.B.2.2.2.1.: Phospholipidmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.2.2.2.: Phospholipidmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

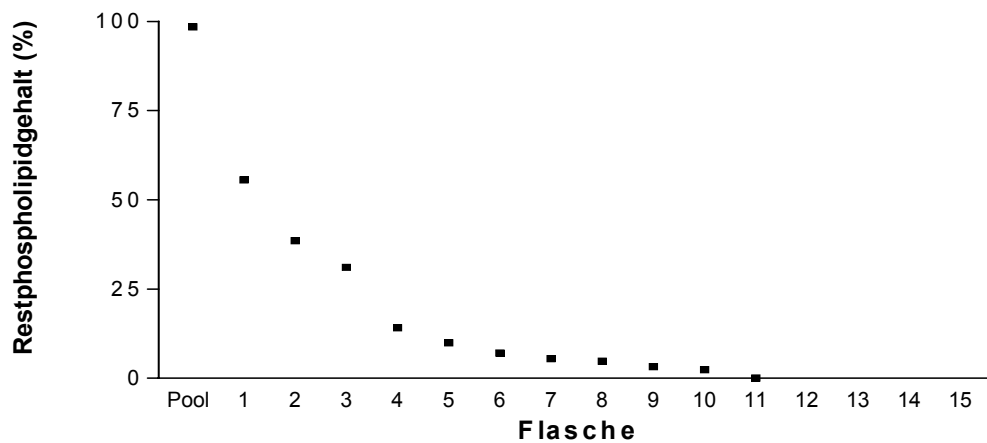


III.B.2.2.2.3.: Phospholipidmenge der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche. Ein Symbol entspricht der Phospholipidmenge einer abgeteilten Portion Spülflüssigkeit (ca. 500 ml) in µg des Patienten J02. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

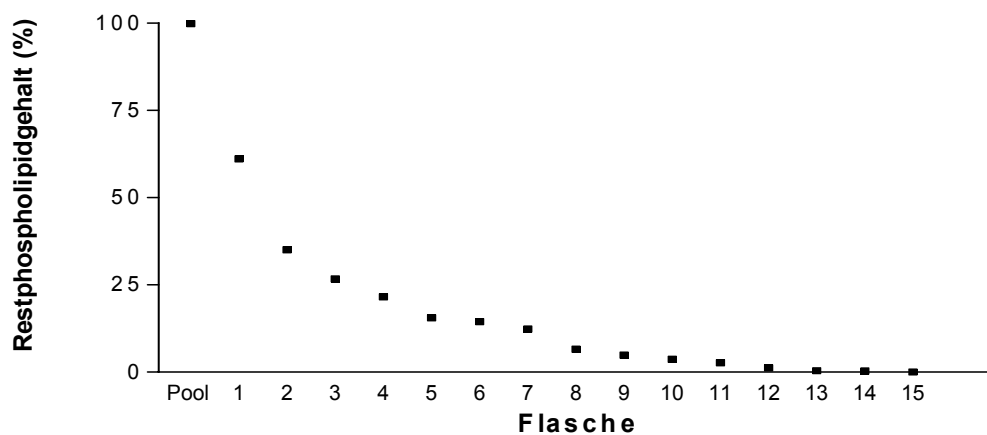
Ähnlich wie bei der Bestimmung der Konzentration, erkennt man auch hier, dass nur bei der zweiten Lavage eine deutliche Anhebung der Phospholipidgeamtmenge in den Spülflaschen nach der PFC Einspülung zu erkennen ist.

III.B.2.2.3. Phospholipide % gesamt

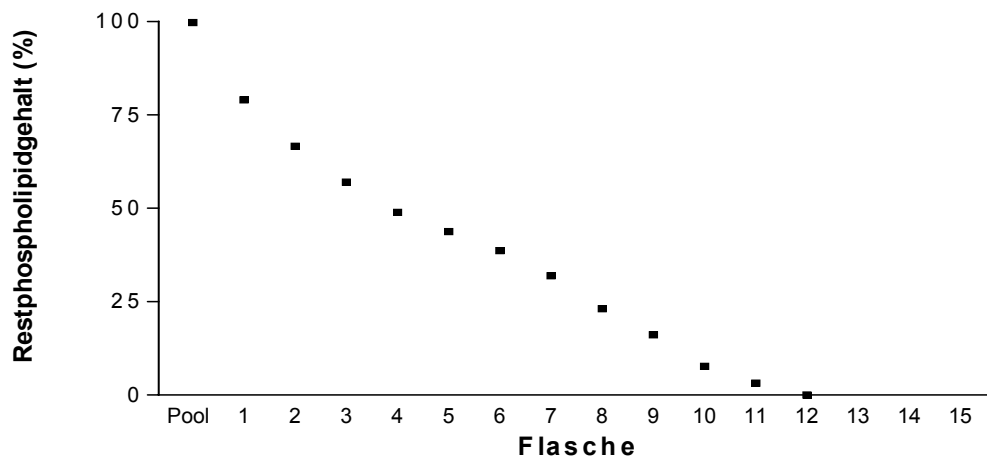
Der Restphospholipidgehalt, welcher noch in der Lunge verblieben ist, nach der jeweiligen Spülportion, wurde als nächstes graphisch dargestellt.



III.B.2.2.3.1.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 6. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.2.3.2.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der rechten Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 7. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



III.B.2.2.3.3.: Darstellung des Restphospholipidgehaltes, welcher noch in der Lunge verbleibt in %, der einzelnen Flaschen von einer Halblungenlavage der linken Seite mit 100 ml PFC Einspülung nach der 8. Flasche des Patienten J02. Ein Symbol entspricht der Gesamtpospholipidmenge, welche noch in der Lunge zurückbleibt in % von der anfänglich in der Lunge vorhandenen Phospholipidmenge. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Im Bereich der PFC Einspülung lässt sich bei allen 3 Halblungenlavagen eine leichte "Sattelbildung,, feststellen. Diese beruht darauf, dass in diesem Bereich die immer darauffolgende Flasche mehr Phospholipid beinhaltet als wie es für eine gleichmäßig abnehmende Auswaschkinetik nötig wäre.

III.C. Biophysikalische Funktionen

Die biophysikalischen Eigenschaften der BAL wurden in den LA's mit Hilfe des Kapillarsurfactometers ermittelt. Für jede der untersuchten Proben wurden die Werte % open und der Initialdruck ermittelt.

III.C.1. Pool

III.C.1.1. %open

Für zwei pädiatrische (J01,J02) und einen adulten PAP Patienten (A04), sowie für den Patienten mit Cholesterolpneumonitis (C01) und die 10 Kontrollpatienten wurde für die BAL jeweils die Offenzeit der Kapillare ermittelt.

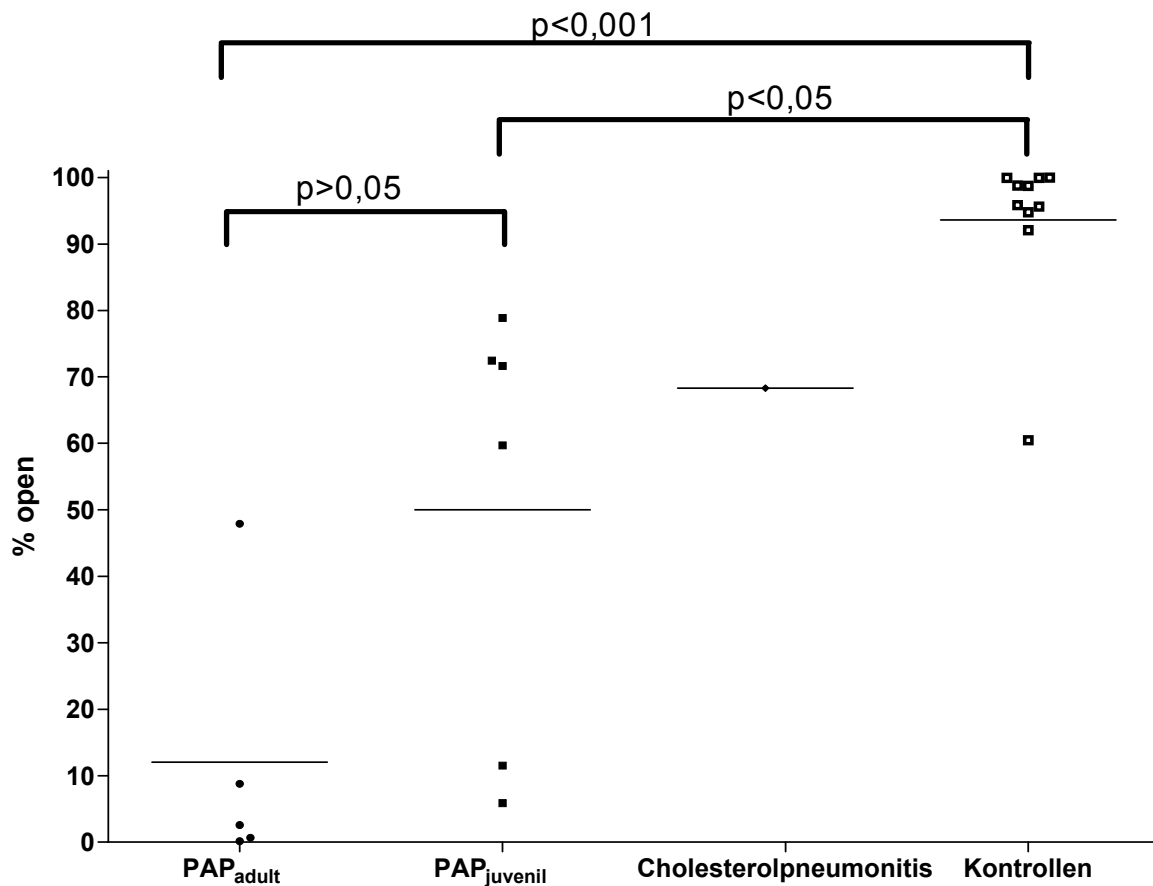


Abb.: III.C.1.1.1.: Darstellung des %open der BAL von einem adulten PAP Patienten (A04), zwei juvenilen PAP Patienten (J01,J02), des Patienten mit Cholesterolpneumonitis (C01) und 10 Kontrollpatienten. Mediane sind angegeben. Es wurde der Kruskal Wallis Test ($p < 0,0005$) mit anschließendem Dunn's post hoc Test durchgeführt.

Gegenüber den Kontrollen waren die Offenzeiten der Kapillaren sowohl der juvenilen ($p < 0,05$), als auch der adulten ($p < 0,001$) PAP Patienten signifikant erniedrigt. Zwischen den adulten und juvenilen Patienten ergaben sich keine signifikanten

Unterschiede ($p>0,05$). Dieses Ergebnis lässt auf eine reduzierte Surfactantfunktion der Patienten mit PAP schließen.

III.C.1.2. Initial pressure

Für zwei pädiatrische (J01,J02) und einen adulten PAP Patienten (A04), sowie für den Patienten mit Cholesterolpneumonitis (C01) und die 10 Kontrollpatienten wurde jeweils für die BAL der Initialdruck der Kapillare ermittelt.

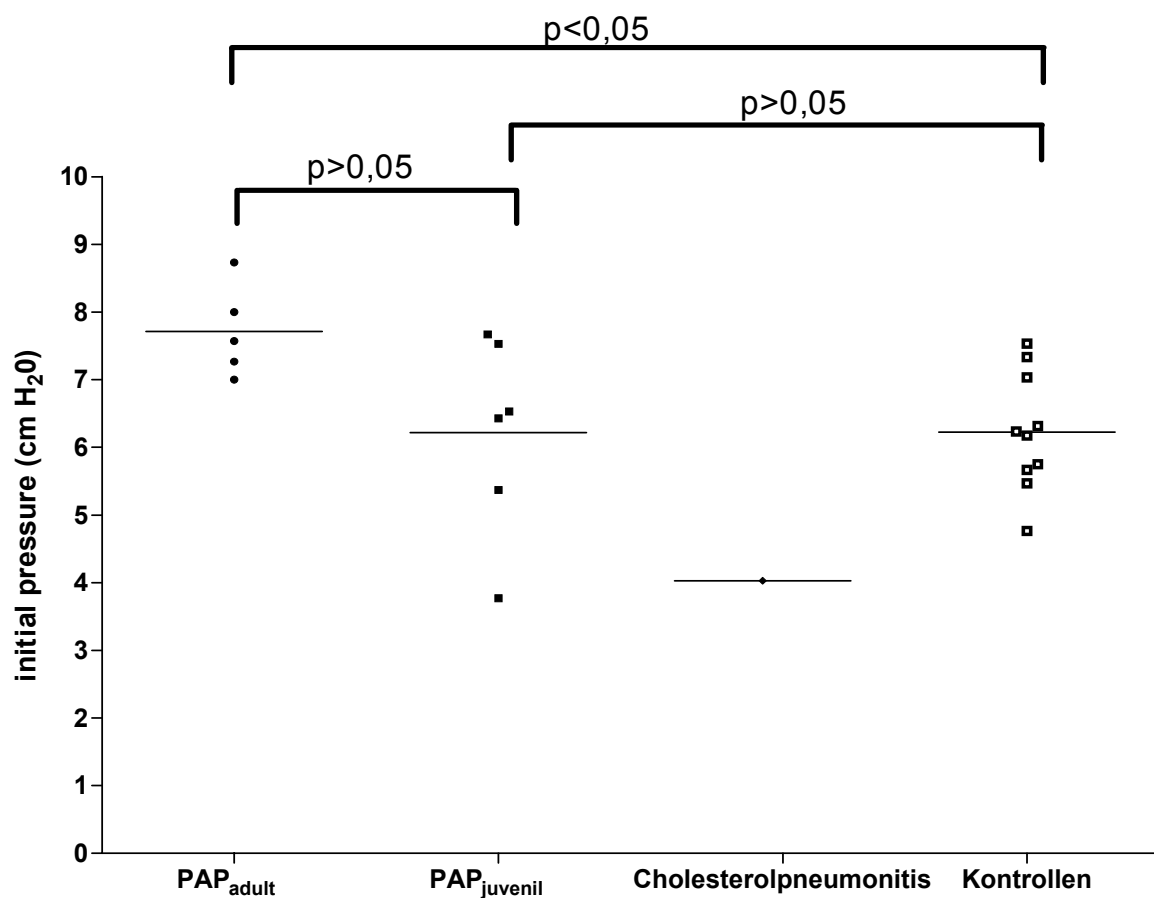


Abb.: III.C.1.2.1.: Darstellung des Initialdrucks der BAL von einem adulten PAP Patienten (A04), zwei juvenilen PAP Patienten (J01,J02), des Patienten mit Cholesterolpneumonitis (C01) und 10 Kontrollpatienten. Mediane sind angegeben. Es wurde der Kruskal Wallis Test ($p=0,0423$) mit anschließendem Dunn's post hoc Test durchgeführt.

Gegenüber den Kontrollen war der Initialdruck der juvenilen PAP Patienten ($p>0,05$) nicht signifikant verändert. Gegenüber den adulten PAP Patienten ergab sich jedoch eine signifikante Erniedrigung des Initialdrucks ($p<0,05$). Zwischen den adulten und juvenilen Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p>0,05$). Da ein

erhöhter Initialdruck auf einen leichteren Verschuß der Bronchiolen schließen lässt, zeigt sich bei adulten PAP Patienten eine signifikant schlechter Surfactantfunktion.

III.C.2. Verlauf während der Lavage

III.C.2.1. % open

Um die Veränderung der Surfactantfunktion über den Verlauf der Lavage beurteilen zu können, wurde von 2 juvenilen (J01, J02) und von 2 adulten (A04, A06) Patienten mit PAP die Offenzeit der Kapillare als Parameter der Surfactantfunktion zu verschiedenen Zeitpunkten der Lavage gemessen.

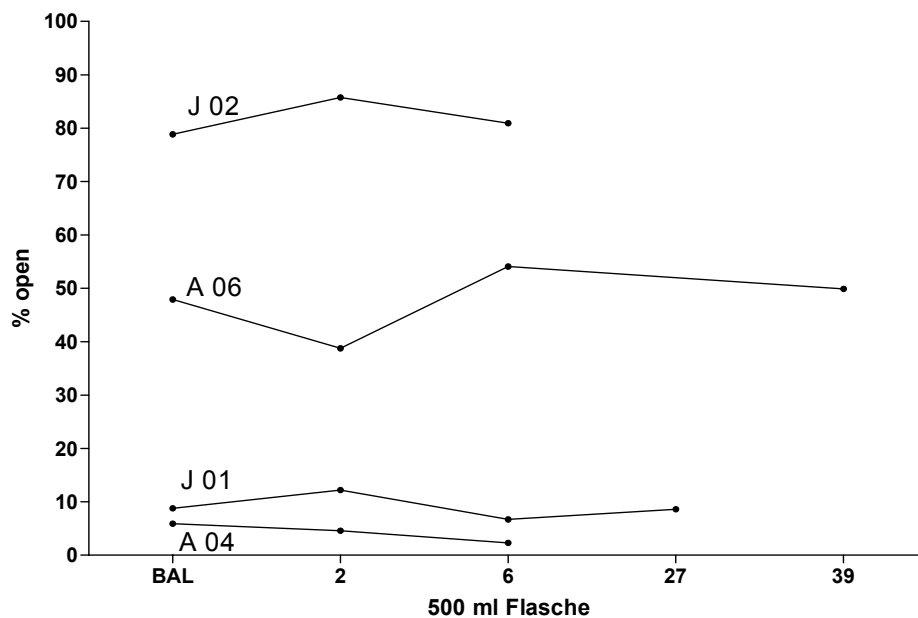


Abb.: III.C.2.1.1.: Darstellung des %open der BAL und einzelner Flaschen der Patienten J01, J02, A04, A06.

Es lässt sich keine hyperbole Kinetik, analog der anderen Lavageparameter, erkennen. Der Wert % open zeigt über den Verlauf der Lavage bei den einzelnen Flaschen keine signifikante Veränderung über den Verlauf der Lavage.

III.C.2.2. Initial pressure

Auch der Initialdruck wurde für die o.g. Patienten über den Verlauf der Lavage bestimmt.

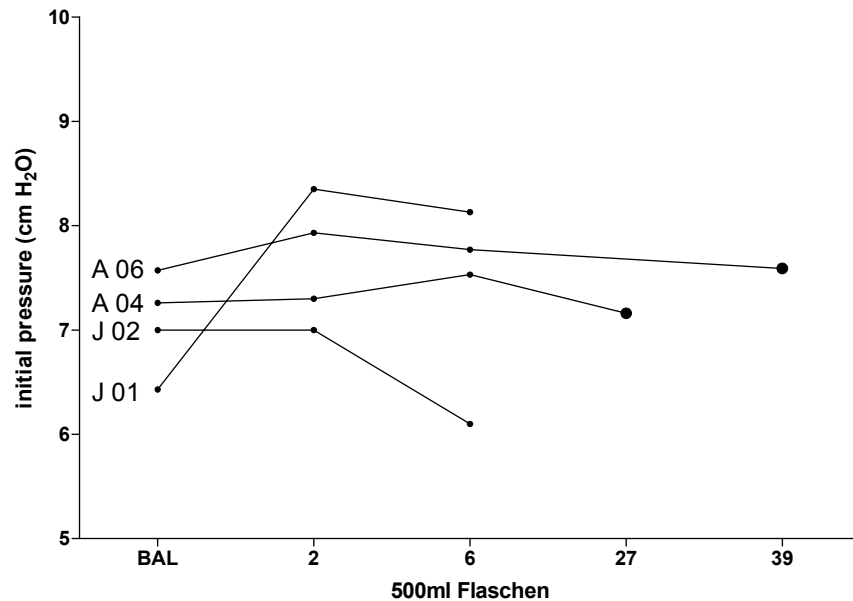


Abb.: III.C.2.2.1.: Darstellung des initial pressure der BAL und einzelner Flaschen der Patienten J01, J02, A04, A06.

Auch bei dem initialen Druck lässt sich keine hyperbole Kinetik, wie bei den anderen Lavageparametern, erkennen. Der initiale Druck ergibt über den Verlauf der Lavage bei den einzelnen Flaschen keine erkennbare Veränderung. Die Schwankung der Werte ist geringer als bei den Werten des % open.

III.C.2.3. Korrelation % open zu initial pressure

Üblicherweise bedingen erniedrigte % open Werte auch erhöhte Initialdruckwerte im Kapillarsurfactometer.

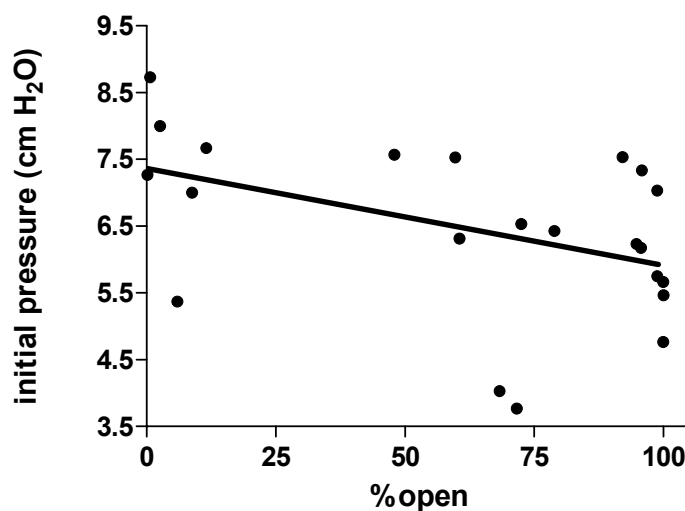


Abbildung III.C.2.3.1.: Streudiagramm der Korrelation des initial pressures mit den Werten % open (Spearman $p = 0,0199$) mit linearer Regressionsgerade

Der Wert $p < 0,0199$ zeigt, dass es eine signifikante Korrelation zwischen dem Initialdruck und der Öffnungszeit der Kapillare gibt. Je niedriger die % open Werte sind, desto höher sind die initialen Drücke.

III.D. Erarbeitung einer Monitoring Methode für die Auswascheffizienz einer Lavage

III.D.1. Bestimmung der geeigneten Wellenlänge

Um ein Höchstmaß an Empfindlichkeit zu erreichen, sollte die Absorptionsmessung immer bei dem Absorptionsmaximum der zu bestimmenden Substanz erfolgen, da sich im Maximum bei Konzentrationsänderungen die größten Veränderungen der Absorption ergeben. Bei der Bestimmung des Absorptionsmaximums einer unbekannten Substanz oder eines Substanzgemisches, wie in unserem Fall, bietet es sich an, ein vollständiges Absorptionsspektrum über den gesamten Bereich des ultravioletten Lichtes (200nm – 400nm) und visuellen Lichtes (400nm – 800 nm) aufzunehmen, um das Absorptionsmaximum zu bestimmen und anhand von diesem die geeignete Wellenlänge für die quantitative Bestimmung festzulegen.

Für die Bestimmung der Absorptionsspektren wurde ein Einstrahl-Photometer verwendet. Es wurde bei der gleichbleibenden Temperatur von 20 °C gemessen und destilliertes Wasser als Nullwertabgleich benutzt. Die verwendeten Küvetten waren aus Quarz und hatten einen Lichtdurchgang von 5 mm (Abb. III.D.1.1.).

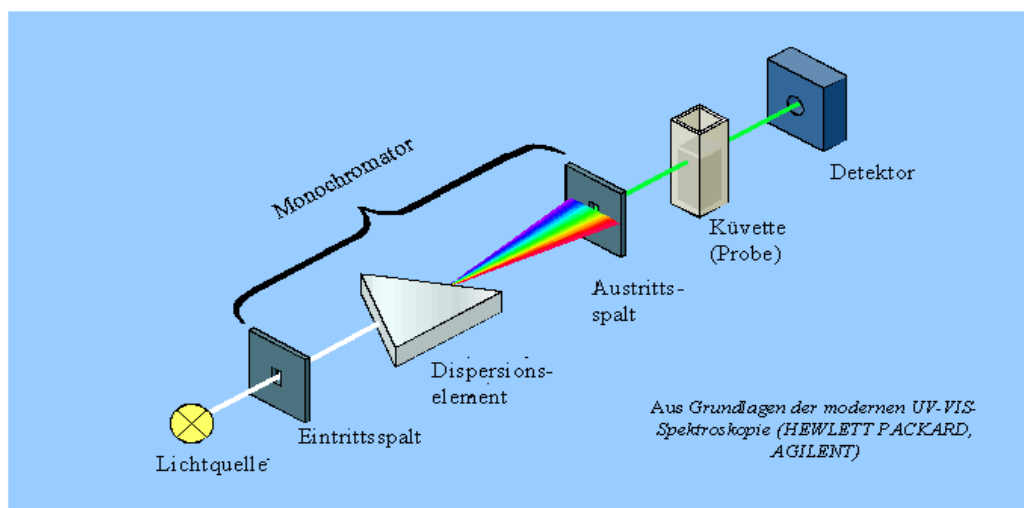


Abb. III.D.1.1.: Schematische Darstellung eines Einstrahl – Absorptionsphotometers

Zunächst wurde die Eigenabsorption des verwendeten Lösungsmittels getestet. Das Lösungsmittel ist hier immer 0,9%ige Kochsalzlösung. Es wurde also ein Absorptionsspektrum für das Lösungsmittel 0,9% NaCl mit Aqua dest. als Referenz aufgenommen (III.D.1.2.).

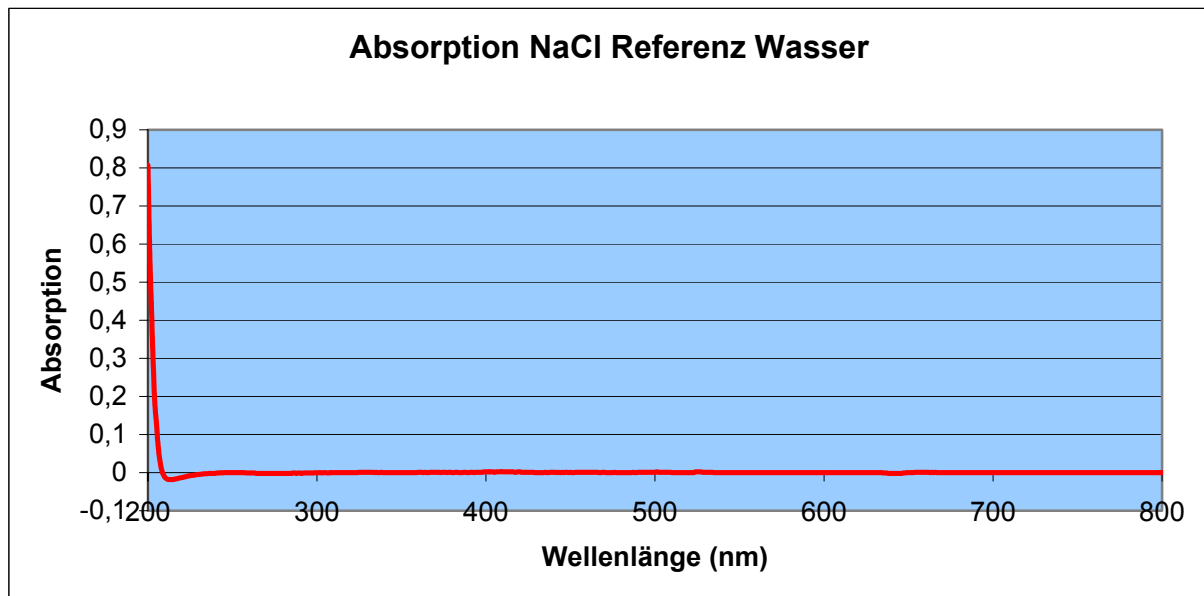


Abb. III.D.1.2.: Darstellung des Absorptionsspektrums einer 0,9%igen NaCl-Lösung. Auf der Ordinate wurde die Absorption und auf der Abszisse die Wellenlänge in Nanometern von 200 nm bis 800 nm angegeben.

Anhand des erhaltenen Absorptionsspektrums war zu erkennen, dass 0,9% ige NaCl Lösung eine Durchlässigkeitsgrenze bei 208 nm hat. Dies bedeutet, dass Mess-Wellenlängen unterhalb von 208 nm nicht sinnvoll/möglich sind, da die dort vorhandene Eigenabsorption des Lösungsmittels die Messung zu stark beeinflusst.

Im Anschluß wurden für den Pool und die Flaschen 1-7 der Lavage des Patienten J02 vom 29.11.2002 Absorptionsspektren, mit 0,9%igen NaCl. Lösung als Blindwert, aufgenommen (III.D.1.3.). Bei der Auswertung der Spektren kann man erkennen, das ihr Verlauf annähernd identisch ist und nur die Höhe der Absorption kontinuierlich abnimmt. Die Absorption des Pools liegt zwischen der 2. und 3. Flasche, was auf die vorgeschaltete Zentrifugation des Pools zurückzuführen ist. Der Verlauf der Spektren ist nahezu identisch: Im niedrigen Wellenlängenbereich ist eine sehr hohe Absorption erkennbar, die bei steigender Wellenlänge steil abfällt. Bei 280 nm erreicht die Kurve ihr Absorptionsmaximum. Im Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts (400 nm-800 nm) beginnt die Kurve kontinuierlich sehr flach, linear, abzufallen. Je konzentrierter die Proben sind, desto höher ist ihre Absorption in allen Wellenlängenbereichen.

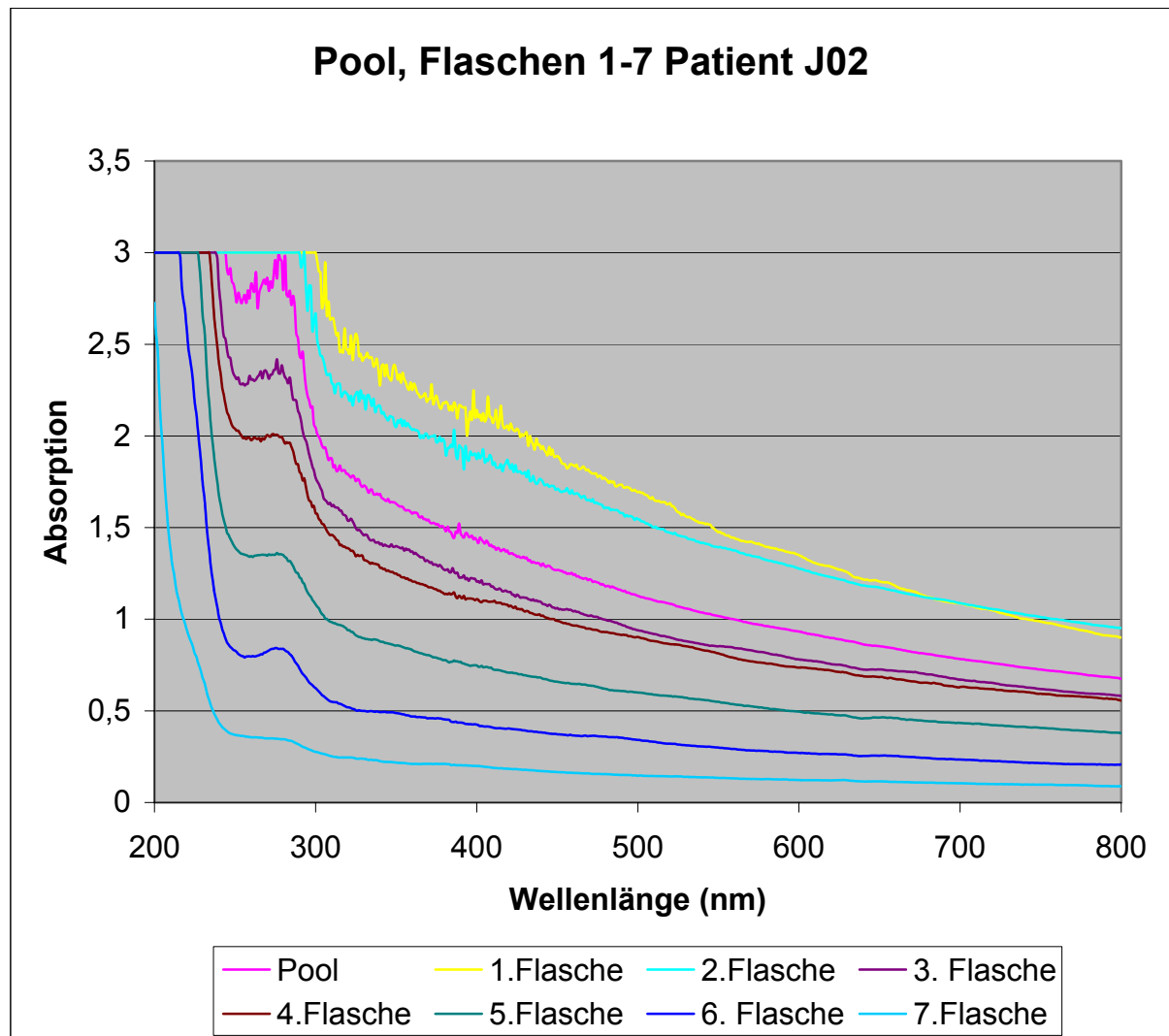


Abb. III.D.1.3.: Darstellung der Absorptionsspektren von Pool und 1.-7. Flasche des Patienten J02 mit 0,9%iger NaCl Lösung als Referenz. Auf der Ordinate wurde die Absorption und auf der Abszisse die Wellenlänge in Nanometern von 200 nm bis 800 nm angegeben.

Da das Photometer eine Absorptionsgrenze bei 3 aufweist, ergibt sich bei höher konzentrierten Proben das Problem, dass erst in einem Absorptionsbereich von weniger als 3 sinnvolle Werte gemessen werden können.

Das Ziel ist, in nativen Lavagen, ohne Verdünnung, eine sinnvolle Absorption messen zu können. Um dies zu gewährleisten, muß auch bei hoch konzentrierten Lavagen eine Absorption unter der Messgrenze des Photometers messbar sein. Bei Wahl einer zu geringen Wellenlänge kann es möglich sein, dass die Absorption über die Messgrenze des Photometers hinaus geht, also zu hoch ist. Dies erlaubt keine quantitative Differenzierung.

Eine mögliche Wellenlänge für die quantitative Bestimmung wäre das Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge wird

allerdings bei höher konzentrierten Proben die Messgrenze des Gerätes überschritten. Auch ist bis zur 3. Flasche bei dieser Wellenlänge ein starkes Rauschen zu erkennen, welches ebenfalls keine sinnvollen Messungen erlaubt.

Für die quantitative Abschätzung der Auswaschkinetik der Surfactantproteine und Phospholipide wurde die Wellenlänge von 405 nm gewählt. Bei dieser Wellenlänge ist eine sinnvolle und empfindliche Messung von unverdünnten, nativen Lavageproben über den gesamten Meßbereich möglich. Die Wellenlänge von 405 nm liegt im oberen Bereich des fast linear abfallenden Spektrums des sichtbaren Lichtes (400 nm - 800 nm) und außerhalb des Rauschens des UV Bereiches (200 nm - 400 nm).

III.D.2. Auswaschkinetik gemessen als optische Dichte

Um die Veränderungen der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen des sichtbaren Lichtes beurteilen zu können, wurden im Folgenden für die Patienten J01 und J02 die Absorptionswerte der gesamten Lavagen bei 405nm, 540nm und 650 nm gemessen.

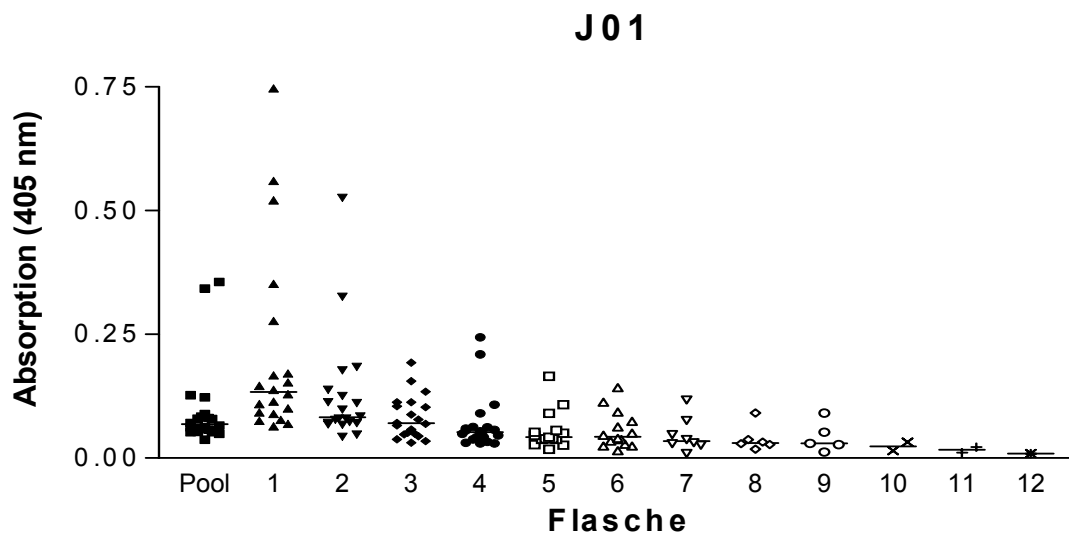


Abb. III.D.2.1.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J01 bei 405nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

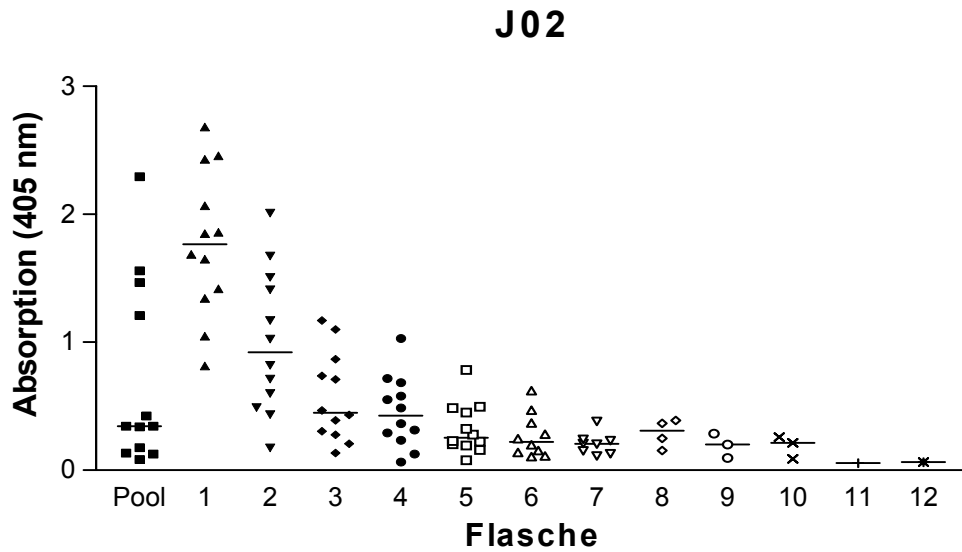


Abb. III.D.2.2.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J02 bei 405nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

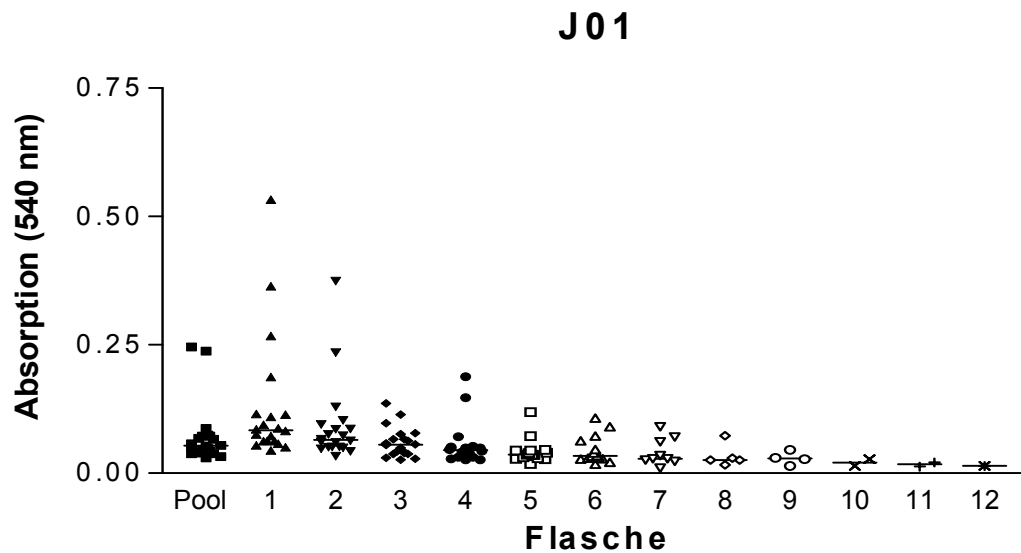


Abb. III.D.2.3.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J01 bei 540nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik siehe Anhang.

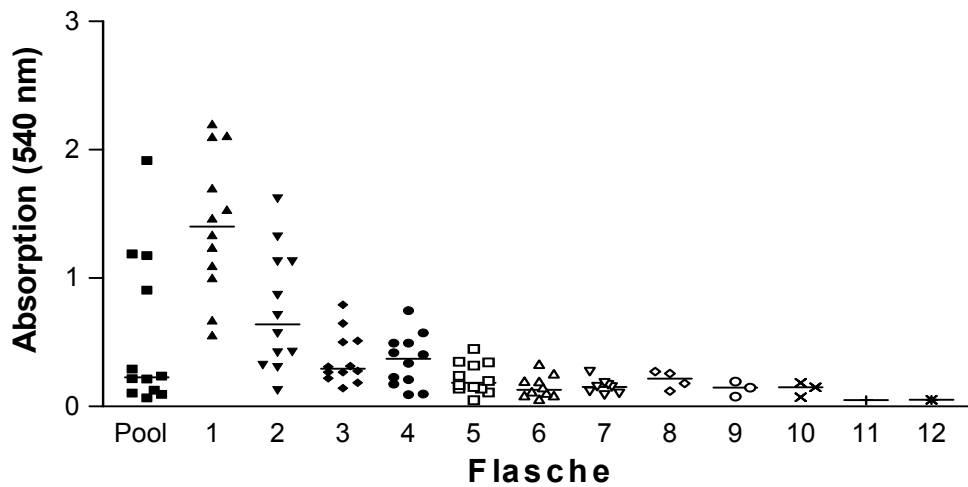
J02

Abb. III.D.2.4.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J02 bei 540nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

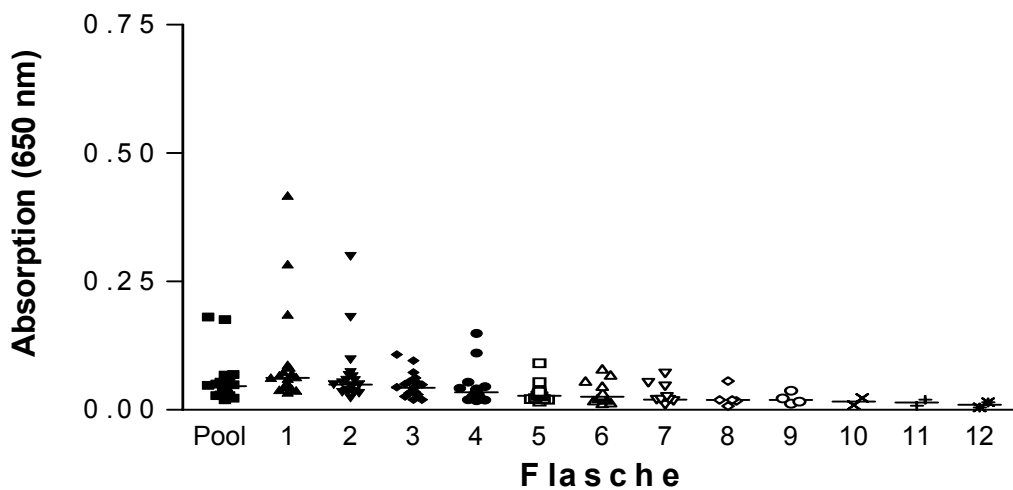
J01

Abb. III.D.2.5.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J01 bei 650nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.



Abb. III.D.2.6.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J02 bei 650nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Anhand der Einzelwerte der Absorption kann man erkennen, dass bei einer Wellenlänge von 405 nm die höchsten Absorptionswerte abzulesen sind. Die zweithöchsten Absorptionswerte wurden bei 540 nm erhalten und die geringsten Werte der Absorption waren bei 650 nm ablesbar. Dieser Versuch bestätigt die Werte der Absorptionsspektren aus Abschnitt III.D.1.. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich der Verlauf auch auf die anderen Patienten übertragen lässt.

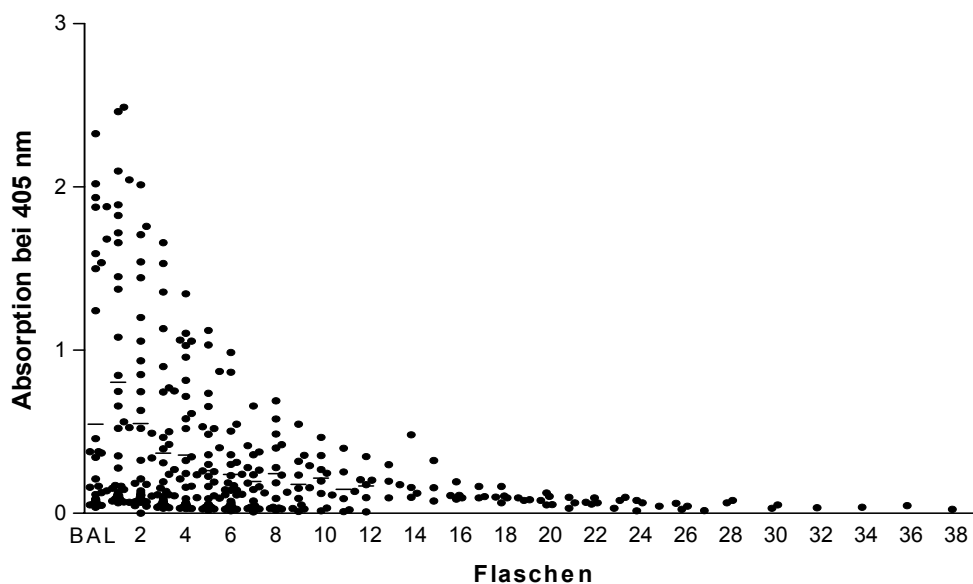


Abb. III.D.2.7.: Absorption der einzelnen Flaschen der Lavagen von J01, J02, J03, J04, A04, A05 und A06 bei 450nm abzüglich des Blindwertes von 0,9% NaCl Lösung. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ließ sich zeigen, dass die hyperbole Auswaschkinetik der gemessenen OD bei allen untersuchten PAP Patienten vorhanden war.

III.D.3. Zusammenhang zwischen der Absorption und einzelnen Surfactantparametern

III.D.3.1. Protein

Um den Zusammenhang zwischen der Absorption und der Konzentration von Gesamtprotein in den einzelnen Portionen der Lavagen beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der Proteinkonzentration mit den Medianwerten der Absorption der einzelnen Lavageportionen aufgetragen (Abb.: III.D.3.1.1.). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass beide Kurven nahezu parallel laufen. Bei gegenüber dem vorherigen Datenpunkt erhöhten Proteinkonzentrationen ist auch die Absorption erhöht. Bei erniedrigten Proteinkonzentrationen ergeben sich auch geringere Absorptionswerte. Dies lässt klar erkennen, dass zwischen der Proteinkonzentration und der Absorption ein enger und direkter Zusammenhang besteht.

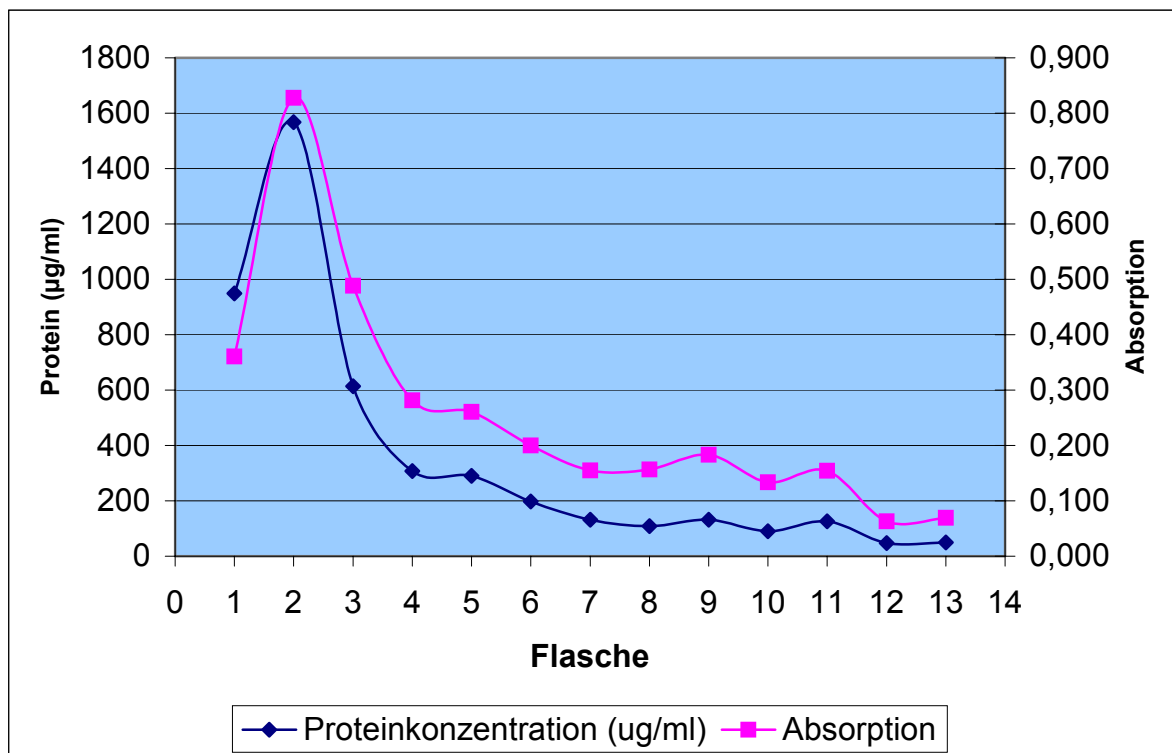


Abb.III.D.3.1.1.: Darstellung der Medianwerte der Proteinkonzentration der einzelnen Spülportionen gegen die Medianwerte der Absorption der Patienten J01 und J02. Auf der Ordinate wurde links die Proteinkonzentration in µg/ml und rechts die Absorption aufgetragen. Auf der Abszisse wurden die einzelnen Spülportionen aufgetragen.

Um die Abhängigkeit der Absorption von der Proteinkonzentration genauer erkennen zu können, wurden im Folgenden die Absorptionswerte gegen die entsprechenden Proteinkonzentrationen aufgetragen. Es wurden getrennte Darstellungen der Patienten J01 und J02 erstellt, da die Patienten stark voneinander abweichende Proteinkonzentrationen und Absorptionswerte haben.

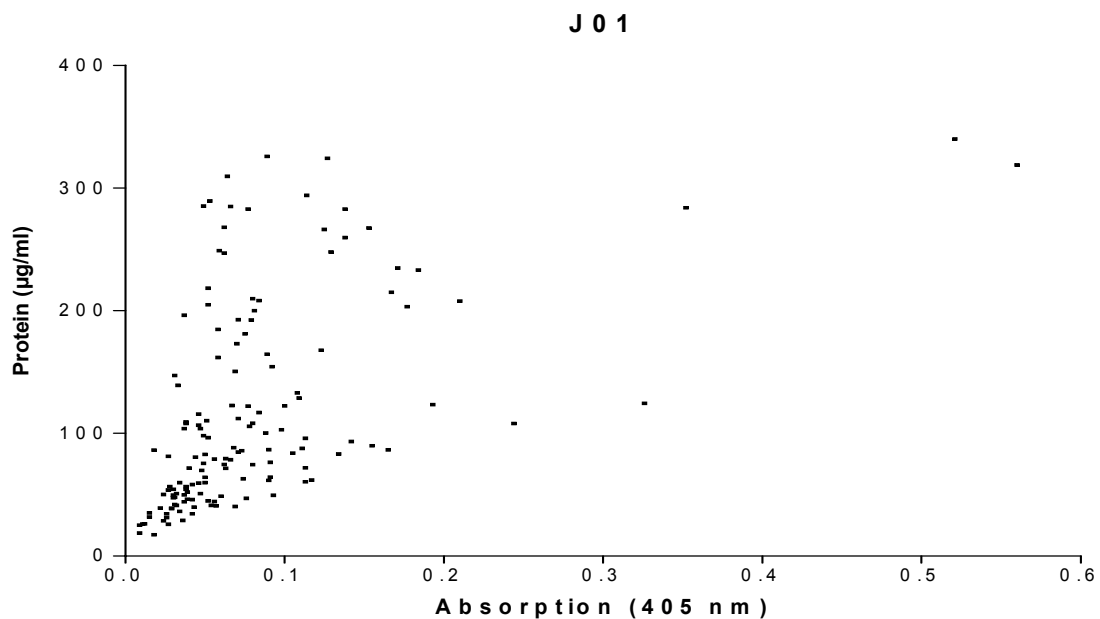


Abb.III.D.3.1.2.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Proteinkonzentration, gemessen bei 152 Wertepaaren von Patient J01. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r = 0,5191$; $r^2 = 0,2695$; $p < 0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

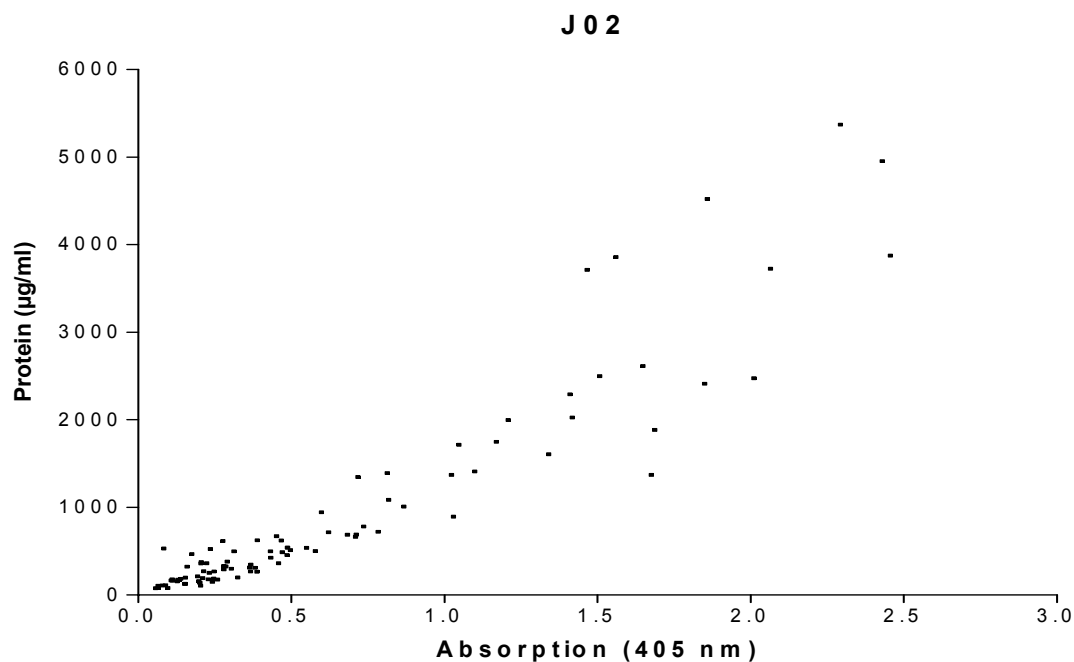


Abb.III.D.3.1.3.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Proteinkonzentration, gemessen bei 103 Wertepaaren von J02. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r = 0,8214$; $r^2 = 0,6747$; $p < 0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei beiden Patienten ergibt sich eine direkte Abhängigkeit der Absorption von der Proteinkonzentration, d.h. Absorption und Proteinkonzentration sind zueinander direkt proportional. Des Weiteren wurde untersucht, ob sich der Verlauf auch auf die anderen Patienten übertragen lässt.

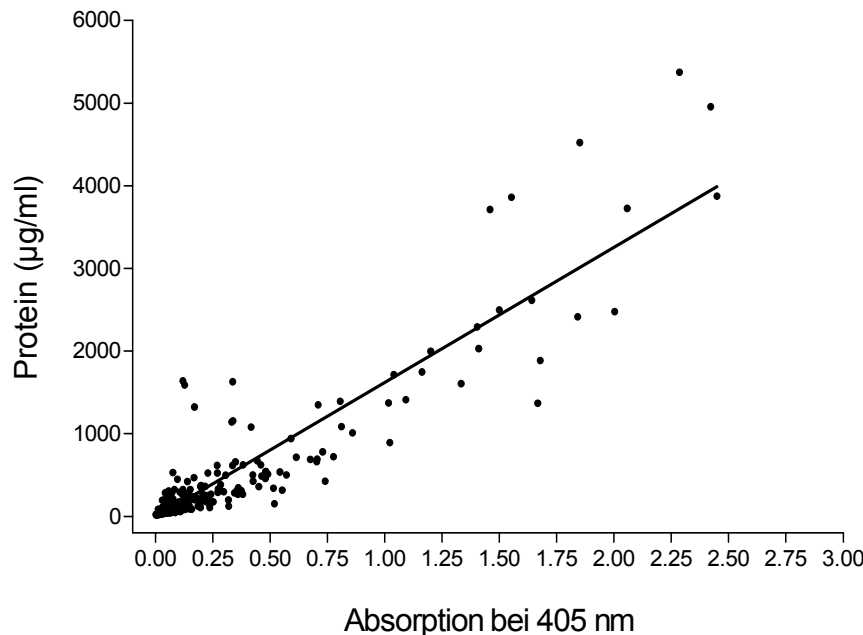


Abb.III.D.3.1.4.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Proteinkonzentration, gemessen bei 103 Wertepaaren von J02. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r=0,9136$; $r^2=0,8346$; $p<0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es ließ sich erkennen, dass sich für die Korrelation zwischen Protein und der optischen Dichte eine hohe Signifikanz ergab.

III.D.3.2. Phospholipid

Um den Zusammenhang zwischen der Absorption und der Konzentration der Phospholipide in den einzelnen Portionen der Lavagen beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der Phospholipidkonzentration mit den Medianwerten der Absorption der einzelnen Lavageportionen aufgetragen (Abb. III.D.3.2.1.). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass beide Kurven nahezu parallel laufen. Bei gegenüber dem vorherigen Datenpunkt erhöhten Phospholipidkonzentrationen ist auch die Absorption erhöht. Bei erniedrigten Phospholipidkonzentrationen ergeben sich auch geringere Absorptionswerte. Dies lässt klar erkennen, dass zwischen der Phospholipidkonzentration und der Absorption ein Zusammenhang besteht.

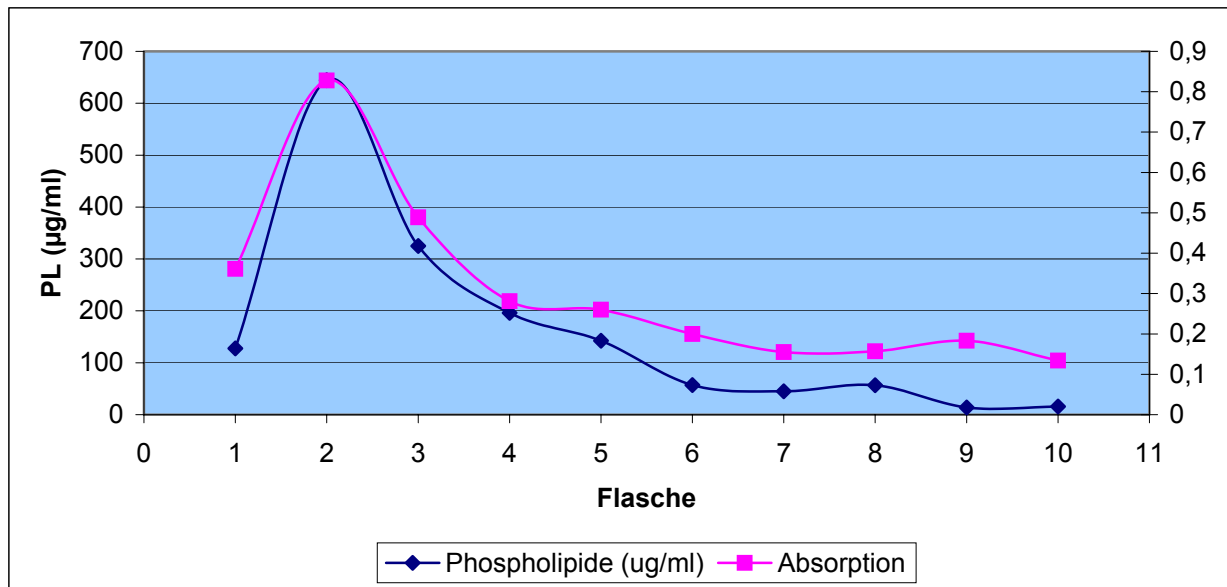


Abb.III.D.3.2.1.: Darstellung der Medianwerte Phospholipidkonzentration der einzelnen Spülportionen gegen die Medianwerte der Absorption der Patienten J01 und J02. Auf der Ordinate wurde links die Phospholipidkonzentration in $\mu\text{g/ml}$ und rechts die Absorption aufgetragen. Auf der Abszisse wurden die einzelnen Spülportionen aufgetragen.

Um die Abhängigkeit der Absorption von der Phospholipidkonzentration genauer erkennen zu können, wurden im Folgenden die Absorptionswerte gegen die entsprechenden Phospholipidkonzentrationen aufgetragen. Es wurden getrennte Darstellungen der Patienten J01 und J02 erstellt, da die Patienten stark voneinander abweichende Phospholipidkonzentrationen und Absorptionswerte haben.

J 0 1

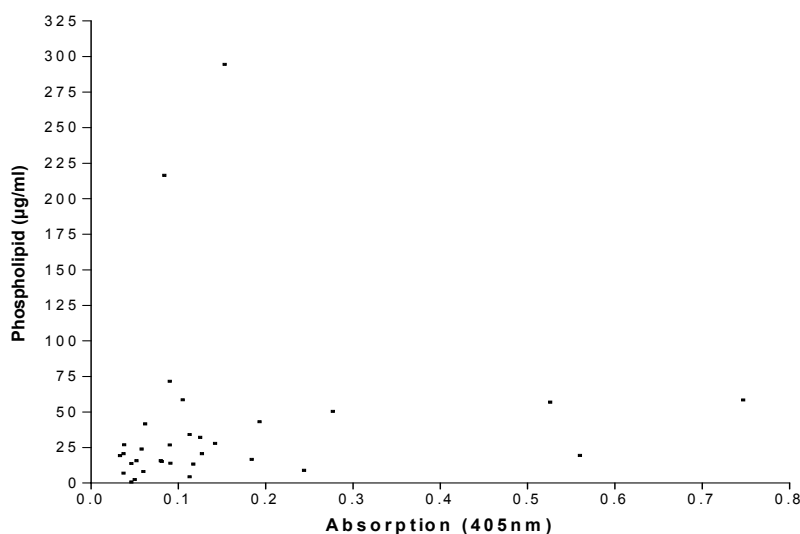


Abb.III.D.3.2.2.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Phospholipidkonzentration, gemessen bei 33 Wertepaaren von J01. Regressionsgerade nach Pearson ist

gegeben: $r = 0,09426$; $r^2 = 0,008884$; $p = 0,6079$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

J 02

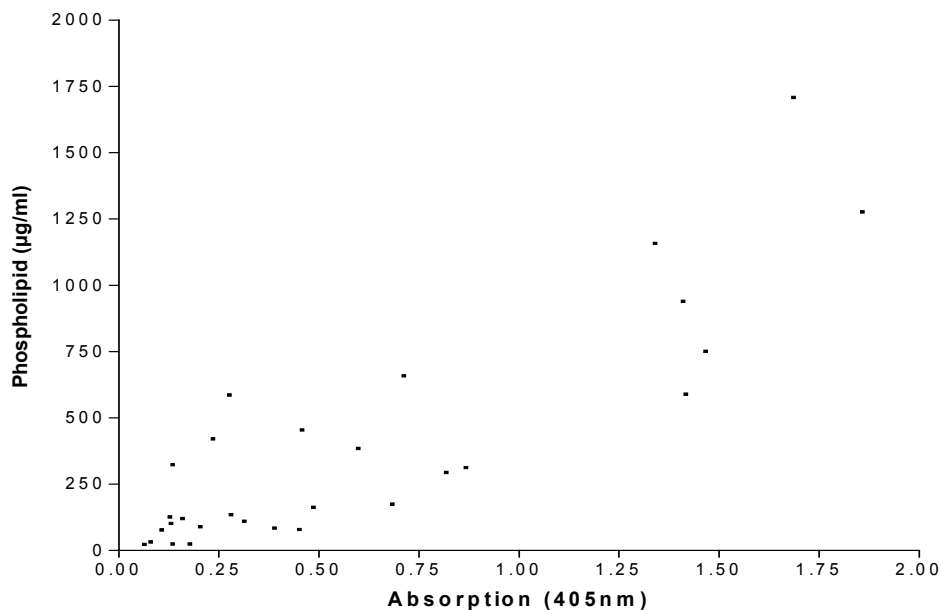


Abb.III.D.3.2.3.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Phospholipidkonzentration, gemessen bei 29 Wertepaaren von J02. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r = 0,8655$; $r^2 = 0,7491$; $p < 0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei dem Patienten J01 ergab sich keine direkte Abhängigkeit der Absorption von der Phospholipidkonzentration. Bei Patient J02 ergab sich, wie bei Protein, eine direkte Abhängigkeit der Phospholipidkonzentration von der optischen Dichte.

III.D.3.3. SP-A

Um den Zusammenhang zwischen der Absorption und der SP-A Konzentration in den einzelnen Portionen der Lavagen beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der SP-A Konzentration mit den Medianwerten der Absorption der einzelnen Lavageportionen aufgetragen (Abb. III.D.3.3.1.). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass beide Kurven nahezu parallel laufen. Bei gegenüber dem vorherigen Datenpunkt erhöhten SP-A Konzentrationen ist auch die Absorption erhöht. Bei erniedrigten SP-A Konzentrationen ergeben sich auch geringere Absorptionswerte. Dies lässt klar erkennen, dass zwischen der SP-A Konzentration und der Absorption ein ursächlicher Zusammenhang besteht.

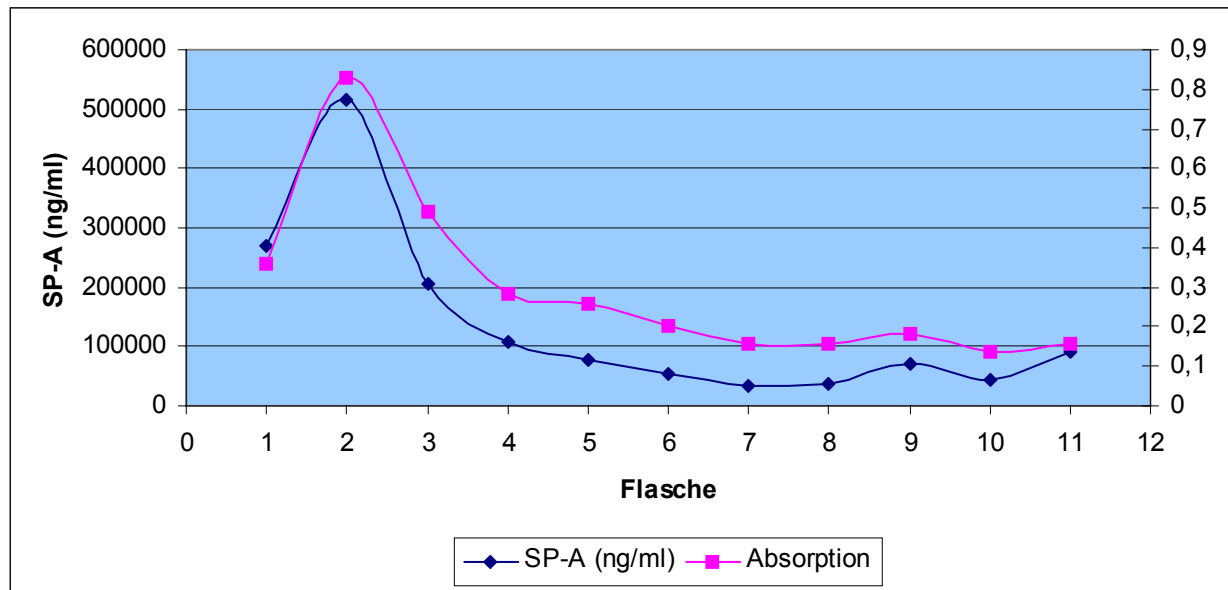


Abb.III.D.3.3.1.: Darstellung der Medianwerte SP-A Konzentration der einzelnen Spülportionen gegen die Medianwerte der Absorption der Patienten J01 und J02. Auf der Ordinate wurde links die SP-A Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ und rechts die Absorption aufgetragen. Auf der Abszisse wurden die einzelnen Spülportionen aufgetragen.

Um die Abhängigkeit der Absorption von der SP-A Konzentration genauer erkennen zu können, wurden im Folgenden die Absorptionswerte gegen die entsprechenden SP-A Konzentrationswerte aufgetragen. Es wurden getrennte Darstellungen der Patienten J01 und J02 erstellt, da die Patienten stark voneinander abweichende SP-A Konzentrationen und Absorptionswerte haben.

J01

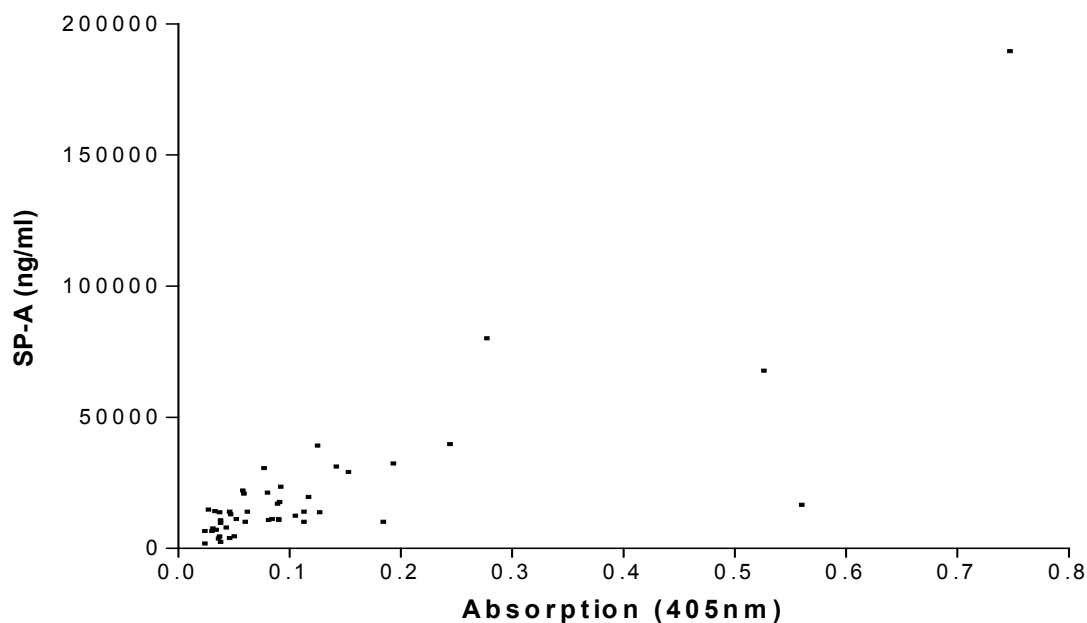


Abb.III.D.3.3.2.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der SP-A Konzentration, gemessen bei 94 Wertepaaren von J01. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r = 0,8078$; $r^2 = 0,6525$; $p < 0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

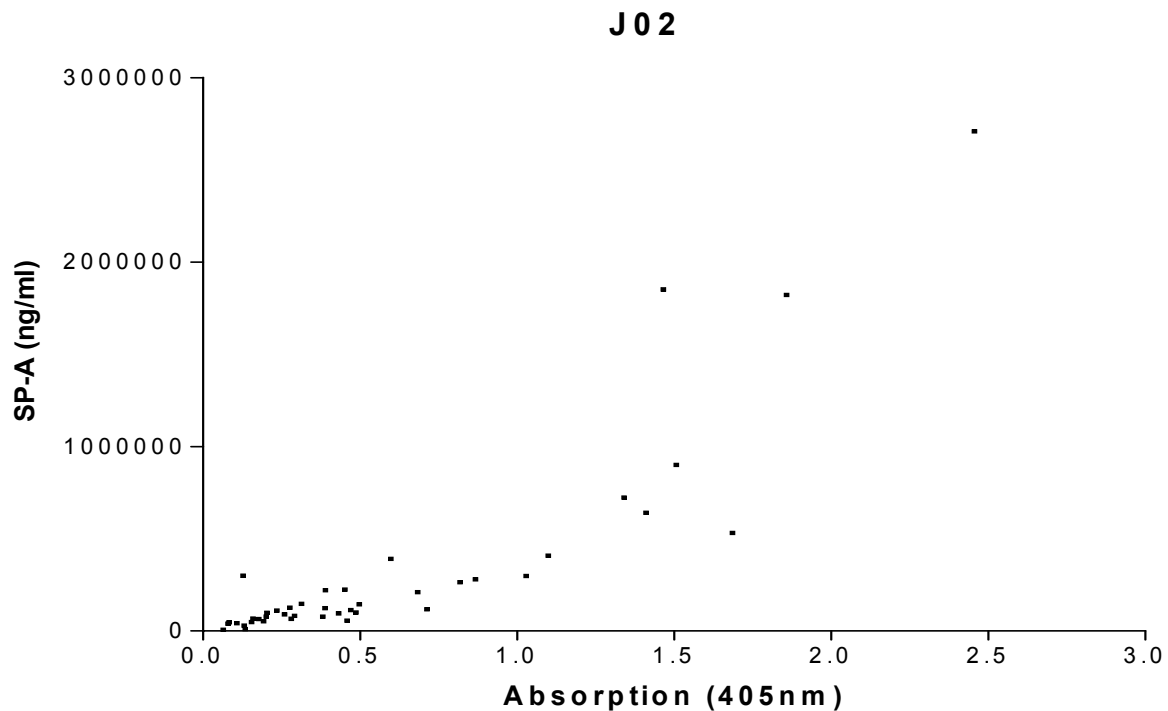


Abb.III.D.3.3.3.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der SP-A Konzentration, gemessen bei 42 Wertepaaren von J02. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r = 0,8661$; $r^2 = 0,7501$; $p < 0,0001$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei beiden Patienten ergibt sich eine direkte Abhängigkeit der Absorption von der SP-A Konzentration, d.h. Absorption und Proteinkonzentration sind zueinander direkt proportional.

III.D.3.4. SP-D

Um den Zusammenhang zwischen der Absorption und der SP-D Konzentration in den einzelnen Portionen der Lavagen beurteilen zu können, wurden die Medianwerte der SP-D Konzentration mit den Medianwerten der Absorption der einzelnen Lavageportionen aufgetragen (Abb.III.D.3.4.1.). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass beide Kurven nahezu parallel laufen. Bei gegenüber dem vorherigen Datenpunkt erhöhten SP-D Konzentrationen ist auch die Absorption erhöht. Bei erniedrigten SP-D Konzentrationen ergeben sich auch geringere Absorptionswerte. Dies lässt klar erkennen, dass zwischen der SP-D Konzentration und der Absorption ein Zusammenhang besteht.

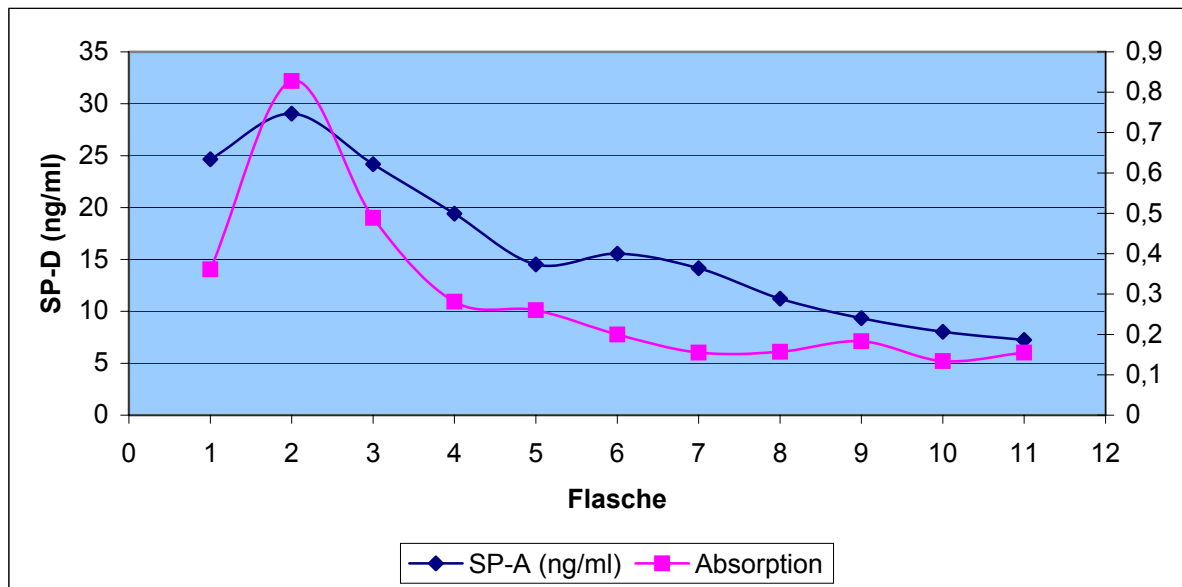


Abb.III.D.3.4.1.: Darstellung der Medianwerte SP-D Konzentration der einzelnen Spülportionen gegen die Medianwerte der Absorption der Patienten J01 und J02. Auf der Ordinate wurde links die SP-D Konzentration in $\mu\text{g/ml}$ und rechts die Absorption aufgetragen. Auf der Abszisse wurden die einzelnen Spülportionen aufgetragen.

Um die Abhängigkeit der Absorption von der SP-D Konzentration genauer erkennen zu können, wurden im Folgenden die Absorptionswerte gegen die entsprechenden SP-D Konzentrationen aufgetragen. Es wurden getrennte Darstellungen der Patienten J01 und J02 erstellt, da die Patienten stark voneinander abweichende SP-D Konzentrationen und Absorptionswerte haben.

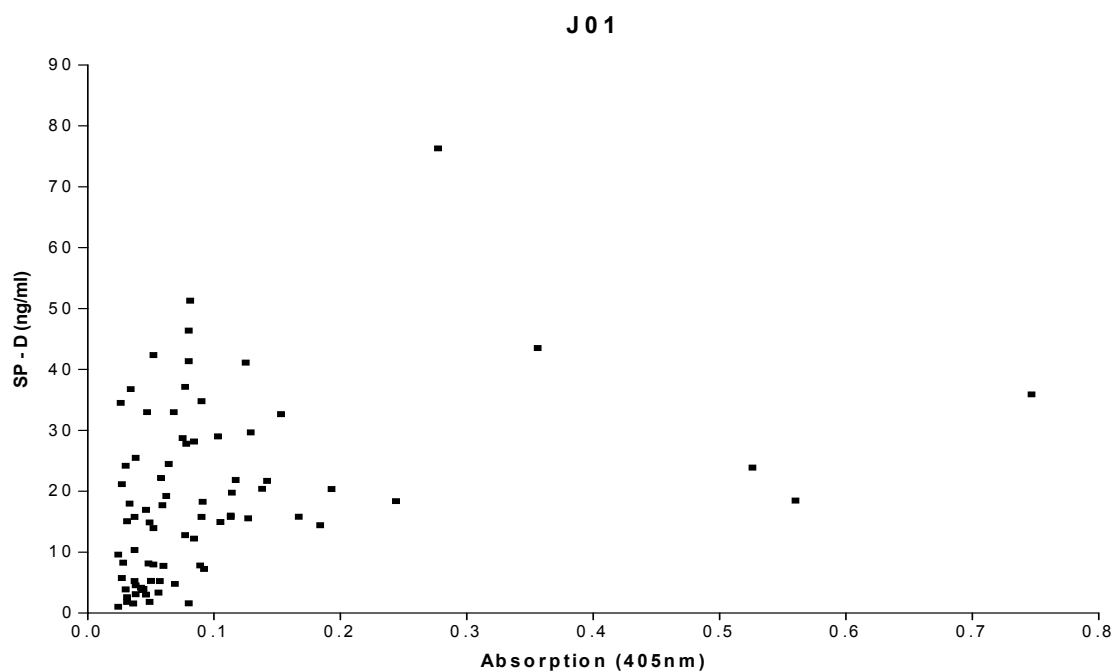


Abb.III.D.3.4.2.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der SP-D Konzentration, gemessen bei 78 Wertepaaren von J01. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r=0,3313$; $r^2=0,1097$; $p=0,0031$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

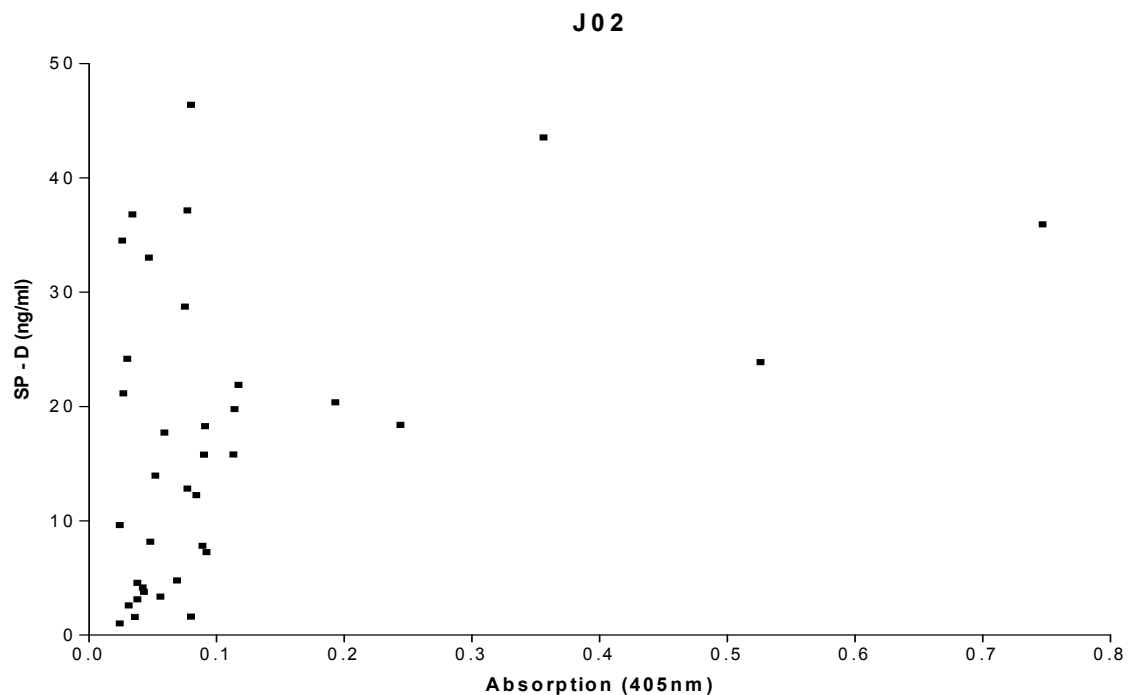


Abb.III.D.3.3.3.: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der SP-D Konzentration, gemessen bei 36 Wertepaaren von J02. Regressionsgerade nach Pearson ist gegeben: $r=0,3881$; $r^2=0,1506$; $p=0,0193$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Bei beiden Patienten ergibt sich eine signifikante Korrelation der SP-D Konzentration und der optischen Dichte zueinander.

III.D.4. Validierung der Methode

Für die Anwendbarkeit dieser Methode, der Abschätzung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Absorption, ist es von entscheidender Bedeutung, die Varianzen beider Methoden zu kennen. Dazu wurde durch Verdünnung der höchsten verfügbaren Konzentrationen der Patienten eine Eichgerade für die Proteinkonzentration erstellt.

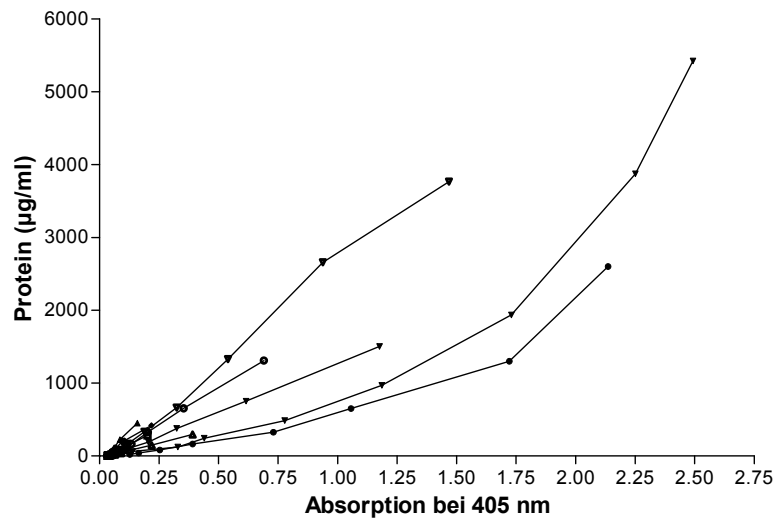


Abb.III.D.4.1.: Eichgraden aller Patienten. Für jeden Patienten wurde eine Spülportion mit relativ hoher Proteinkonzentration, welche zuvor mit dem Bradfordassay bestimmt wurde, schrittweise mit 0,9% NaCl Lösung verdünnt. Es ist die Absorption bei 405 nm gegen die entsprechende Proteinkonzentration aufgetragen. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

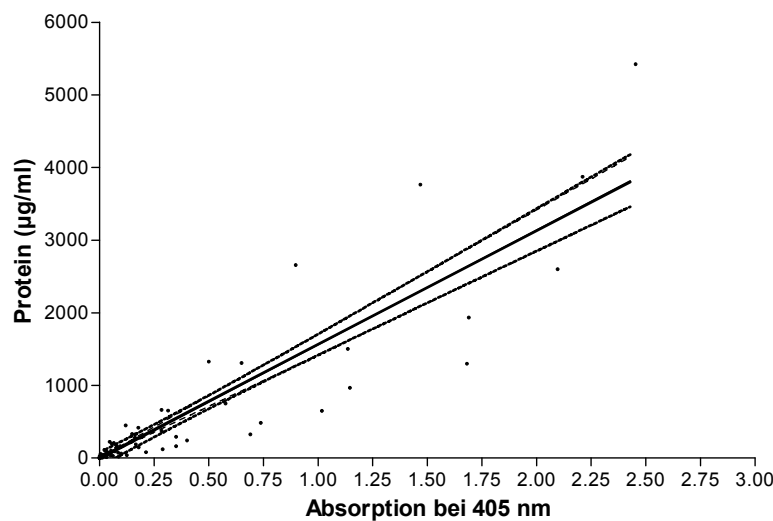


Abb.III.D.4.2.: Eichgrade aller Patienten, erstellt aus den einzelnen Eichgrade der Abb.III.D.4.1.. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Mit Hilfe dieser erstellten Eichgrade wurden nun die erhaltenen Ergebnisse der Messung der optischen Dichte aller Spülportionen aller Patienten in Proteinkonzentrationen umgerechnet und in 2 verschiedenen Bland Altman Plots dargestellt.

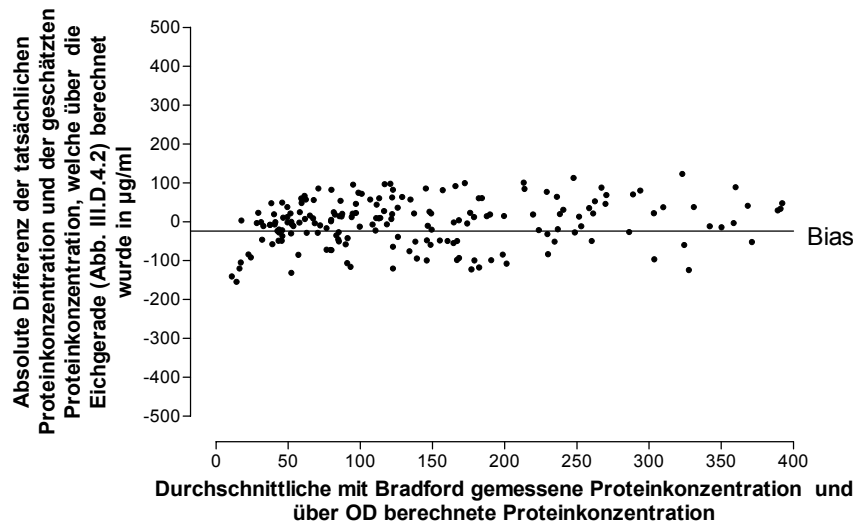


Abb.III.D.4.3.: Bland Altman Plot der absoluten Differenz der tatsächlichen und der über die Eichgerade ermittelten Proteinkonzentration in µg/ml aller Patienten gegen die durchschnittliche Proteinkonzentration. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

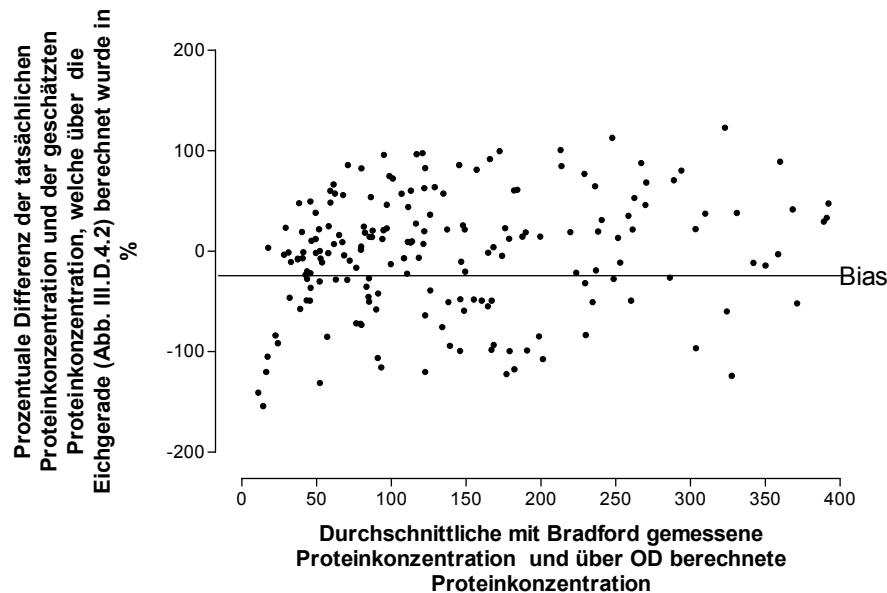


Abb.III.D.4.4.: Bland Altman Plot der prozentualen Differenz der tatsächlichen und der, über die Eichgerade ermittelten Proteinkonzentration in µg/ml aller Patienten gegen die durchschnittliche Proteinkonzentration. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Es lässt sich erkennen, dass sowohl die prozentuale als auch die absolute Abweichung über den gesamten Messbereich gleich bleibt und die prozentuale Abweichung nicht über bzw. unter 100% vom Durchschnitt abweicht.

Anhand der Kontrollgruppe wurde festgestellt, dass gesunde Patienten eine Proteinkonzentration von unter 100 µg/ml in der Lavage haben. Dieser Wert wurde als Schwellenkonzentration für den Endpunkt der Lavage festgesetzt. Bei >90% der

untersuchten Proben unter der Absorption von 0,038 ergaben sich Proteinkonzentrationen von unter 100 µg/ml.

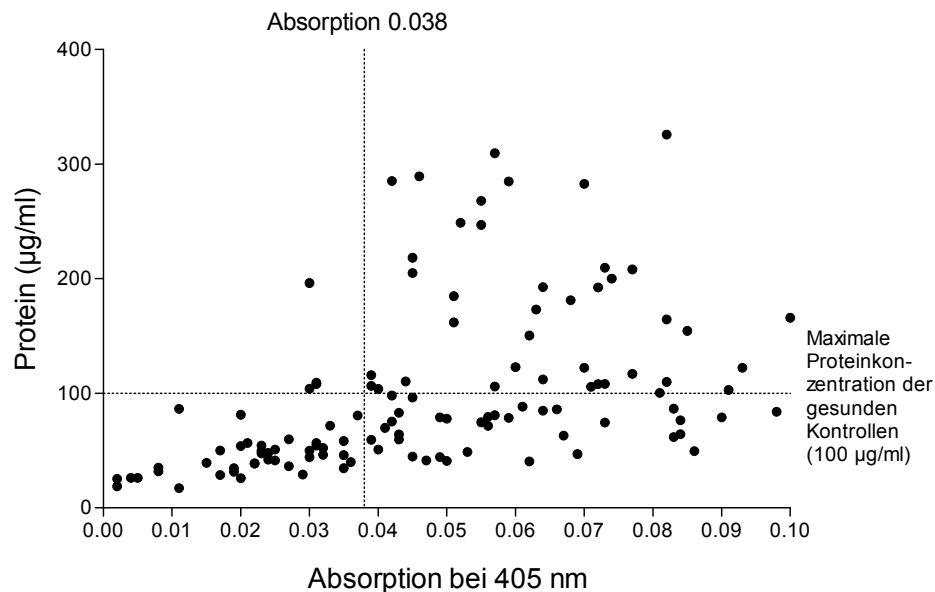


Abb.III.D.4.5.: Darstellung der Proteinkonzentration gegen die Absorption bei 405 nm der Lavageflüssigkeit für jede 500 ml Fraktion von allen PAP Patienten (A01 - A06, J01 - J04) und dem Patienten mit Cholesterlpneumonitis. Der Wert der maximalen Proteinkonzentration der gesunden Kontrollpatienten ist eingezeichnet. Für die gemessenen Werte der optischen Dichte, die < 0.038 lagen ergab sich bei mehr als 90 % der gemessenen Proteinkonzentrationen Werte unter 100 µg/ml. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Man kann davon ausgehen, dass bei 9 von 10 zukünftigen Lavagen, welche bei einer direkt gemessenen optischen Dichte von unter 0,038 abgebrochen werden, eine normale Proteinkonzentration in der Lunge vorliegt.

Zudem wurde eine ROC (Responder Operator Curve) Analyse für den cutt-off Wert 100 µg/ml durchgeführt. Dieser Test beschreibt eine Fläche, „area under the curve“ (AUC), welche die Fähigkeit dieser Methode beschreibt, zwischen Individuen mit und ohne der Erkrankung unterscheiden zu können. In diesem Fall gibt die Größe der Fläche (0-1) die Fähigkeit an, ob zu Recht eine Lavage beendet wird, also eine Proteinkonzentration von unter 100 µg/ml erreicht wurde.

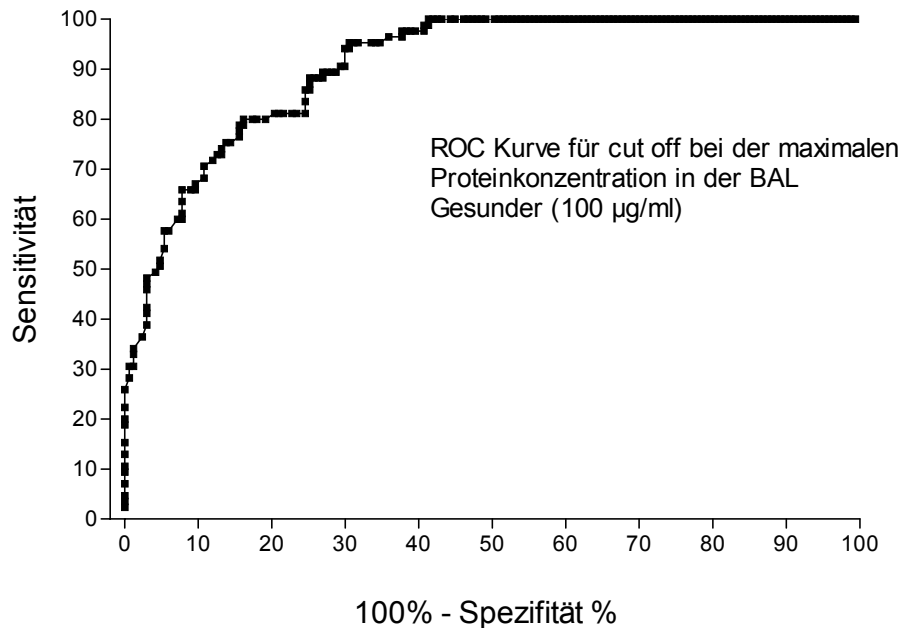


Abb.III.D.4.6.: ROC Kurve für das Beenden der Lavage bei 100µg/ml. Es wurde die Sensitivität gegen 100 %- Spezifität % aufgetragen. Es ergab sich $p < 0.0001$, $\text{area} \pm \text{SD}$: $0,9079 \pm 0.0175$. Einzelwerte und Statistik im Anhang.

Das Ergebnis der ROC Analyse zeigte mit einem p-Wert von $<0,0001$ und einem Wert für die Area von 0,9079 sehr gut, dass mit Hilfe dieses Tests eine sinnvolle und aussagekräftige Unterscheidung zwischen noch zu viel in der Lunge vorhandenem Surfactantmaterial und dem Endpunkt der Lavage getroffen werden kann.

Verschiedene Verunreinigungen der Lavageflüssigkeit können die Absorption der Probe verändern und dadurch verfälschen. Eine häufige Verunreinigung, vor allem in den ersten Flaschen einer BAL, ist Blut. Diese Proben haben eine weit höhere Absorption als die nicht verunreinigte Probe. Da Verunreinigungen der Lavage durch Blut aber meist nur in den ersten Flaschen einer Lavage vorkommen, beeinträchtigen sie meist nicht die entscheidenden Absorptionsbestimmungen am Ende der Lavage. Ein weiterer Störfaktor bei der Absorptionsbestimmung ist die durch Proteine hervorgerufene Schaumbildung. Um die hieraus resultierenden Messfehler zu vermeiden, wurde bei allen Messungen genau darauf geachtet, Schaumbildung zu vermeiden. Es wurde langsam pipettiert und doch auftretende Blasen durch Klopfen oder mit der Pipettenspitze entfernt.

Die alleinige Messung von Absorptionen kann die Genauigkeit der Messung von Proteinen, Phospholipiden und Surfactantproteinen durch spezifische Assays nicht ersetzen, aber sie gibt einen guten Überblick über die Auswaschkinetik von bronchoalveolären Lavagen.

Das Wissen um die direkte Proportionalität von Surfactantparametern und der Absorption ermöglicht eine weitgehende Standardisierung der Lavage. Eine Darstellung des Restproteingehaltes gegen die Absorption lässt erkennen, dass bei einer gemessenen Absorption von unter 0,5 mit Sicherheit schon 70% der zu Beginn in der Lunge vorhandenen Gesamtproteinmenge ausgewaschen wurde.

Bei einer gemessenen Absorption von unter 0,5 war die Restproteinmenge von 70% der gemessenen Proben schon unter 10%. Wird anhand dieser Vorgaben, bei bronchoalveolären Lavagen, ab einer gemessenen Absorption von unter 0,5 die Spülung eingestellt, kann man davon ausgehen, die Lunge von mindestens 70% der Gesamtproteinkonzentration befreit zu haben. Diese Vorgehensweise ermöglicht eine objektive Beurteilung des Fortschrittes einer BAL, im Gegensatz zu der rein subjektiven und jeweils vom Durchführenden der BAL abhängigen, visuellen Trübungsmessung.

Durch diese bessere Kontrolle des Auswaschvorganges können Lavagen zu einem Zeitpunkt beendet werden, an dem eine weitere Spülung der Lunge keine große Effizienz mehr bedeutet. Daraus resultiert unter anderem auch eine Verkürzung der Narkosezeit.

III.E. Weitergehende biochemische Charakterisierung einzelner Patienten

Bei dem Patienten J01 handelt es sich um einen juvenilen Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose. Dieser Patient hat keine Mutation im SP-B Gen, jedoch eine heterozygote Missense Mutation auf dem SP-C Gen. Isoleucin wird an der Stelle 73 gegen Threonin ausgetauscht (I73T).

Sämtliche im Folgenden verwendeten Proben des Patienten J 01 stammen von der Lavage vom 13.12.1999, bei welcher sämtliche Flaschen und der Pool zusammengeführt (gepoolt) wurde.

III.E.1. Patient J01

III.E.1.1. Charakterisierung der Surfactantproteine mittels 1D Gelelektrophorese

III.E.1.1.1. SP-A

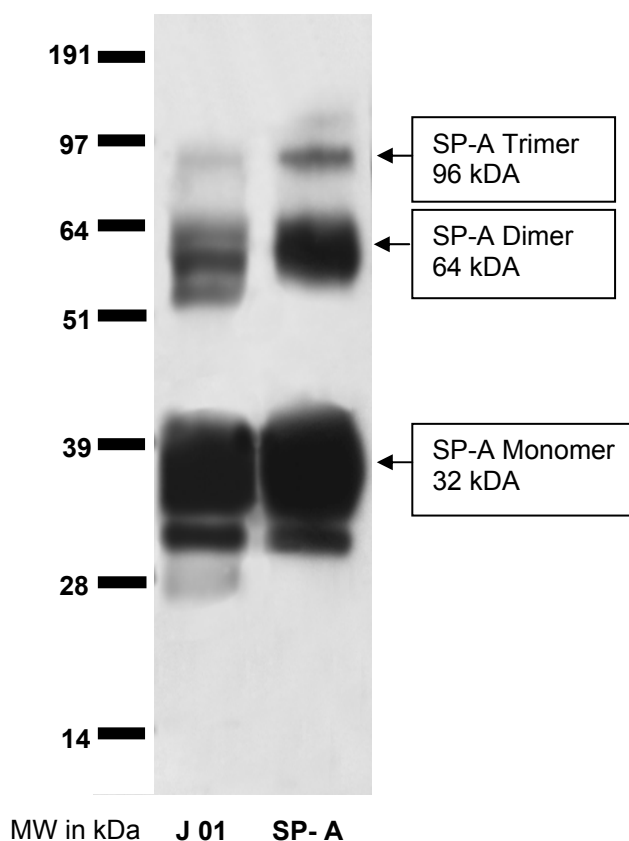


Abb. III.E.1.1.1.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 4-12% Gel. Die Probe wurde vorher denaturiert und reduziert. Als Standard wurde rhSP-A und als Molekulargewichtsmarker SeeBlue® Plus2 verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit polyklonalem Anti humanem SP-A Antikörper aus Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

SP-A ist bei Patient J01 als Monomer, Dimer und Trimer nachzuweisen. Es sind keine abnormalen Veränderungen festzustellen.

III.E.1.1.2. SP-B

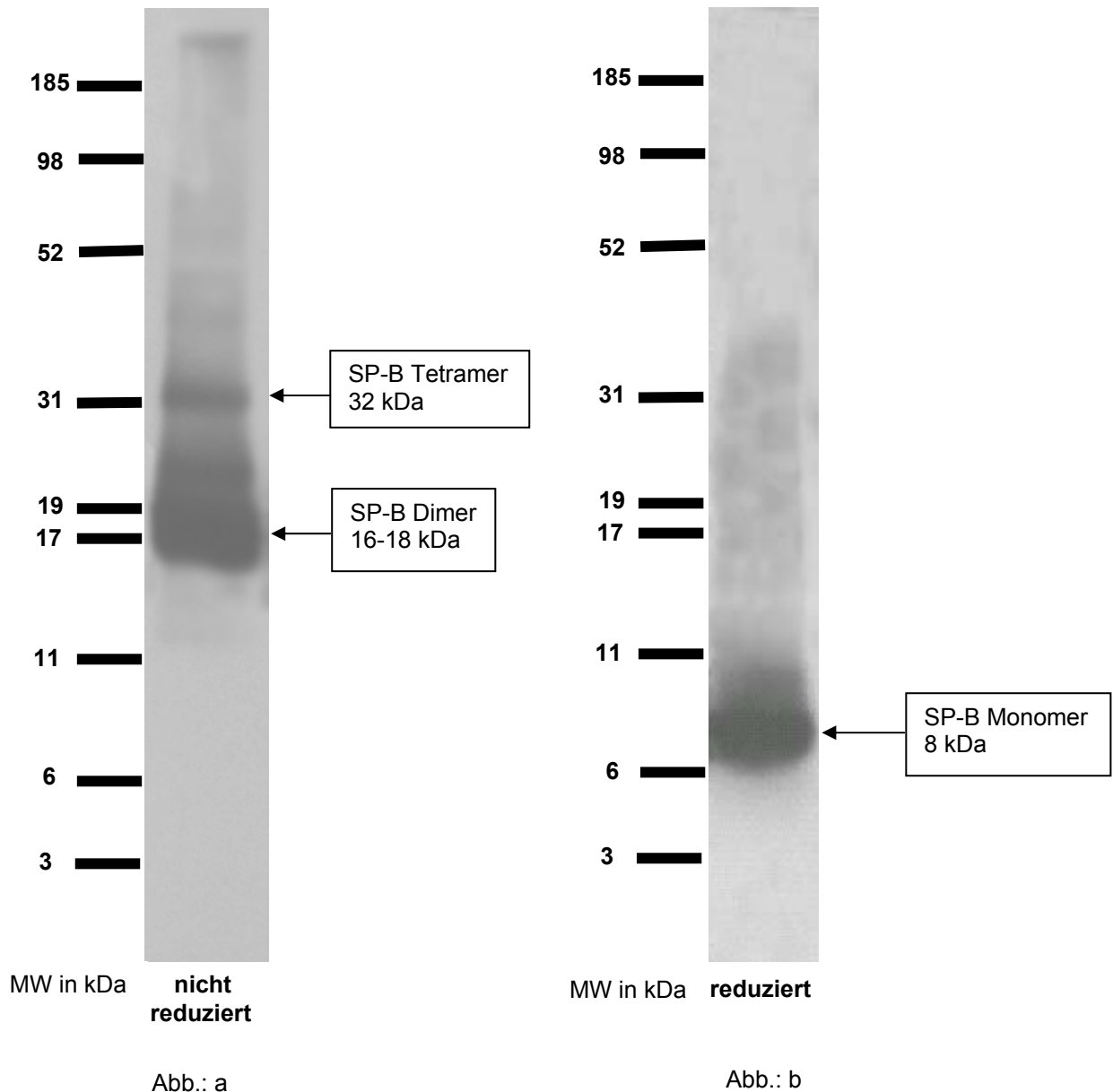


Abb. III.E.1.1.2.1.: Auftrennung von 10 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde vorher denaturiert und einmal reduziert (b) und einmal nicht reduziert (a) aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit polyklonalem SP-B Antikörper vom Kaninchen von J. A. Whitsett inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Bei Patient J01 konnte SP-B in dimerer und tetramerer Form nachgewiesen werden, welches vollständig in die Monomere Form reduziert werden konnte.

III.E.1.1.3. Pro SP-B

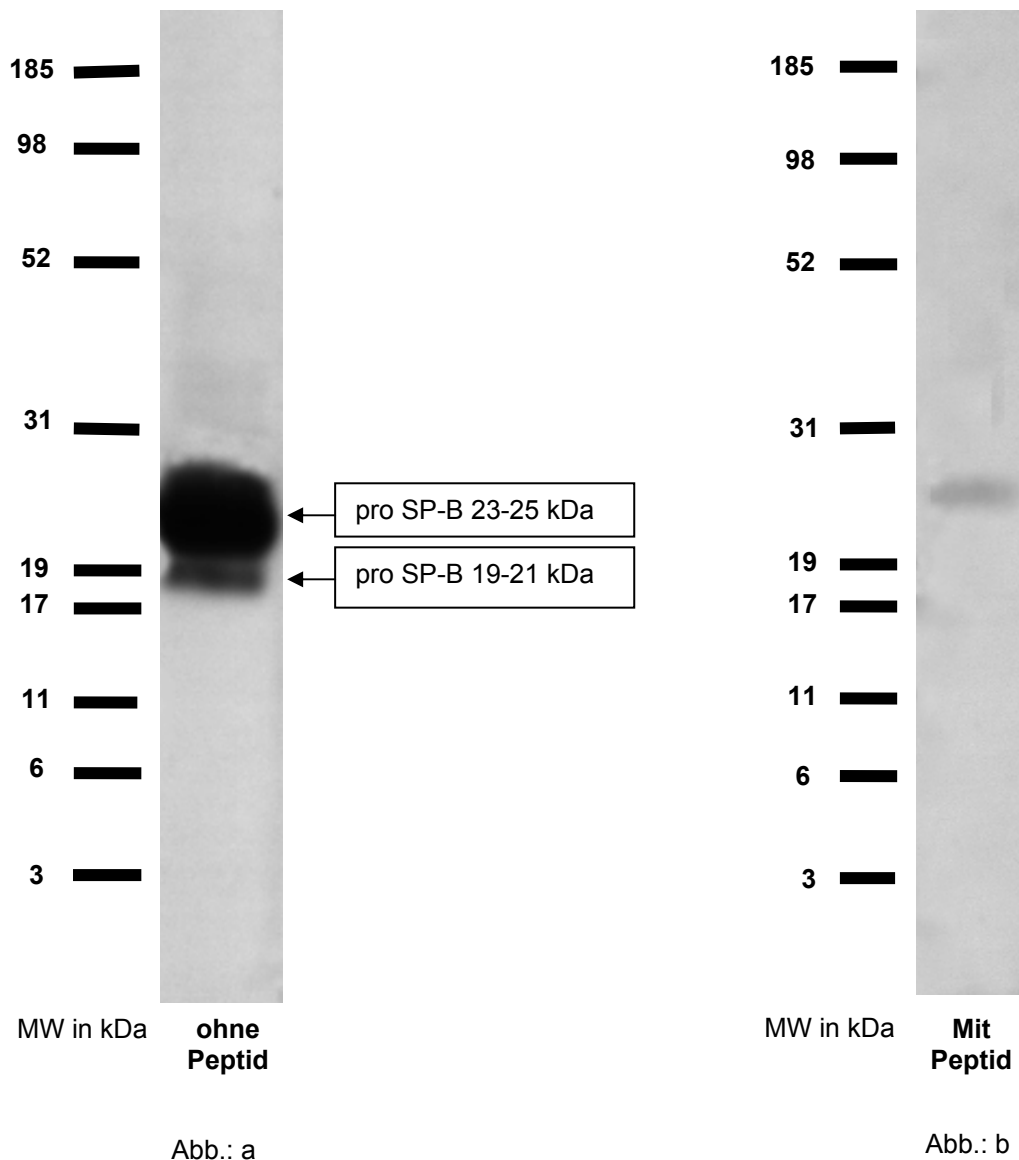


Abb. III.E.1.1.3.1.: Auftrennung von 10 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einen NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotting wurden die Membranen einmal mit CtermB Antikörper (a) und einmal mit CtermB Antikörper plus Peptid (b) inkubiert. Der pro SP-B Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von S. Guttenberg. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Es ließen sich die Proform von SP-B bei 23 –25 und 19 - 21 kDa nachweisen. Beide Proformen ließen sich durch Peptidzugabe selektiv blockieren.

III.E.1.1.4. SP-C

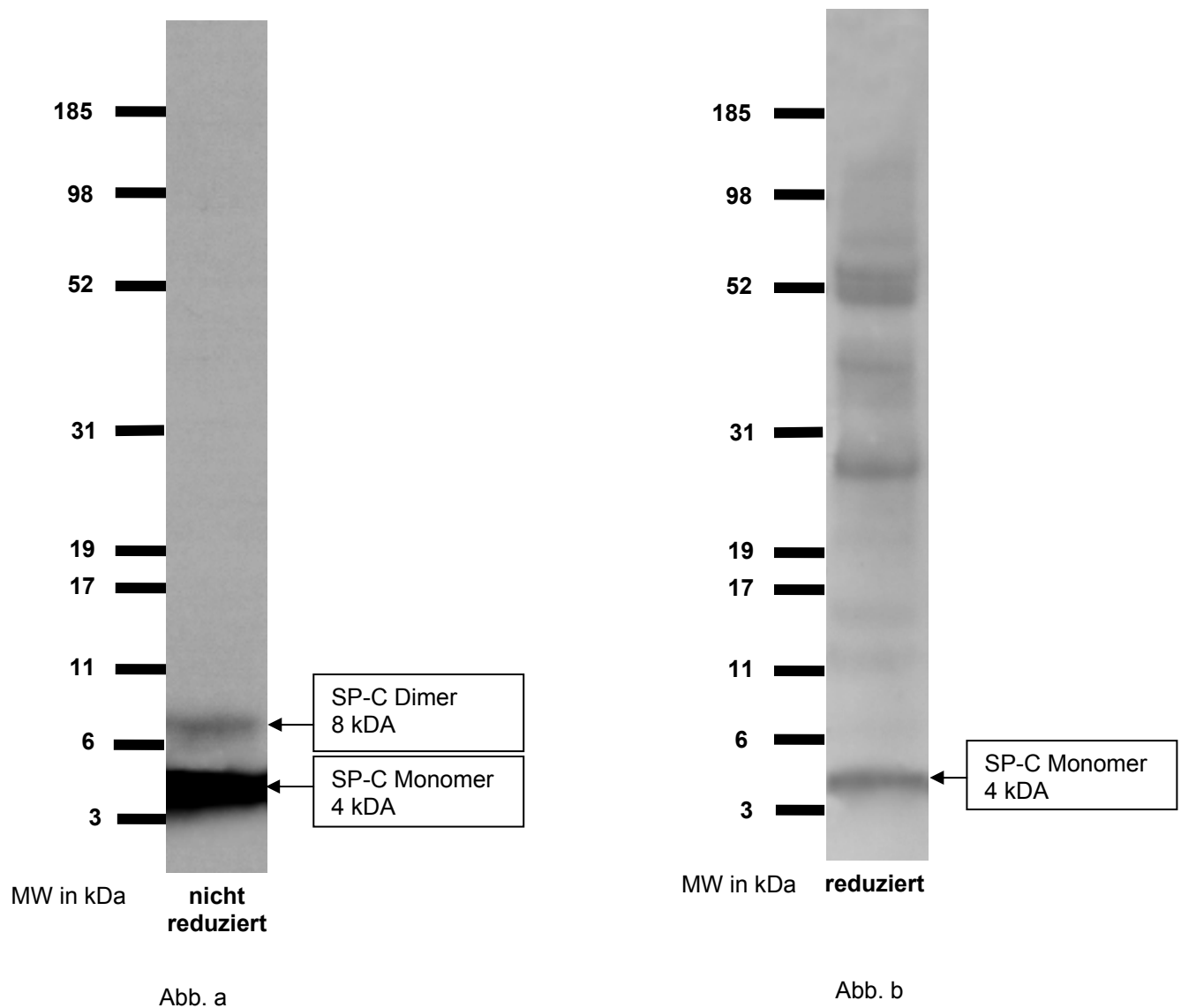


Abb. III.E.1.1.4.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde denaturiert und einmal reduziert (b) und einmal nicht reduziert (a) aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Es konnte reifes SP-C nachgewiesen werden, welches hauptsächlich in der reduzierten monomeren Form vorlag. Durch in vitro Reduktion konnten sämtliche Dimere in die monomere Form umgewandelt werden.

III.E.1.1.5. Pro SP-C (Beers)

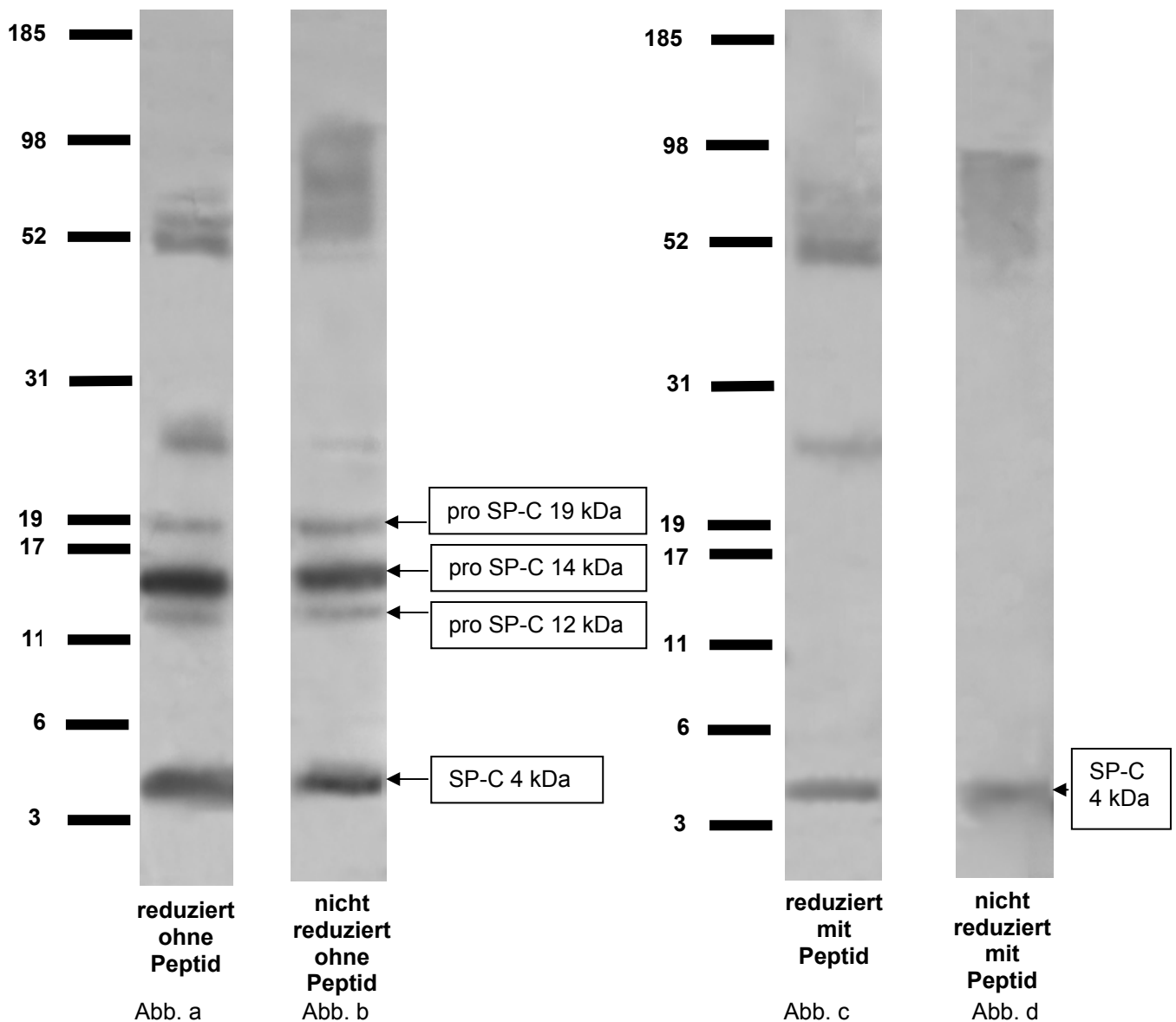


Abb. III.E.1.1.5.1.:

Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Jeweils 2 Proben wurden reduziert (a,c) und 2 Proben wurden nicht reduziert (b,d) aufgetragen. Jeweils 2 Proben wurden ohne Peptid (a,b) und 2 Proben wurden mit Peptid (c,d) inkubiert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurden die Membranen erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit N-ProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. 2 Membranen mit Peptid (c,d) und 2 Membranen ohne Peptid (a,b). Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Neben dem reifen SP-C konnten mit dem Antikörper von Beers weitere pro SP-C Formen nachgewiesen werden bei 12, 14 und 19 kDa. Diese verschwanden nach der

Inkubation des Antikörpers mit dem korrespondierenden Peptid, was auf spezifische SP-C Banden schließen lässt. Zwischen dem reduzierten und nicht reduzierten Zustand gab es keine Unterschiede.

III.E.1.1.6. Pro SP-C (Whitsett)

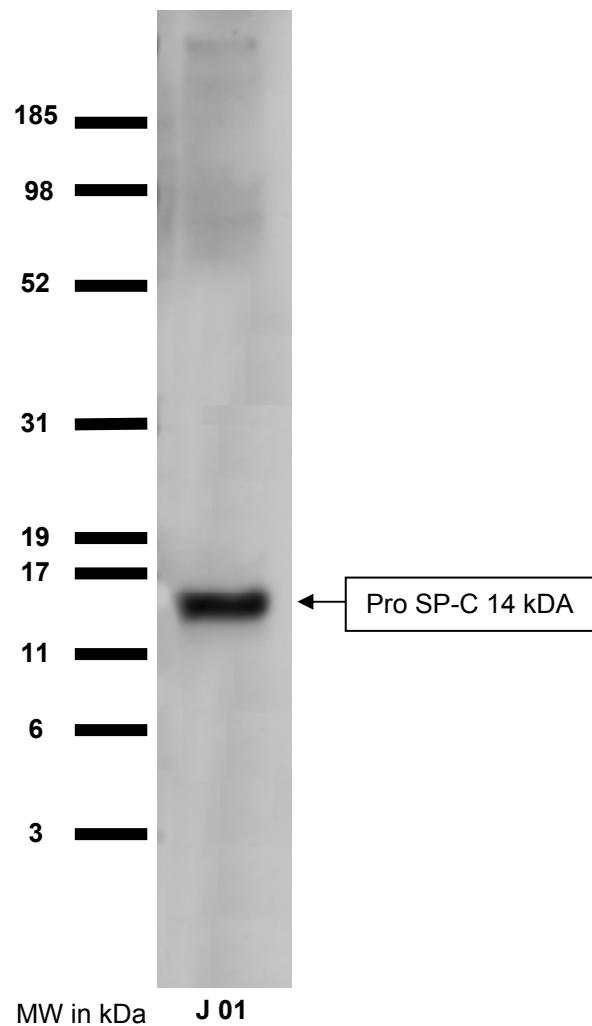


Abb. III.E.1.1.6.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde reduziert und denaturiert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit polyklonalem proSP-C Antikörper von Whitsett inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal und vom Kaninchen. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Inkubation mit dem Antikörper gegen pro SP-C von Whitsett ergab lediglich eine Bande bei 14 kDa.

III.E.1.1.7. SP-D

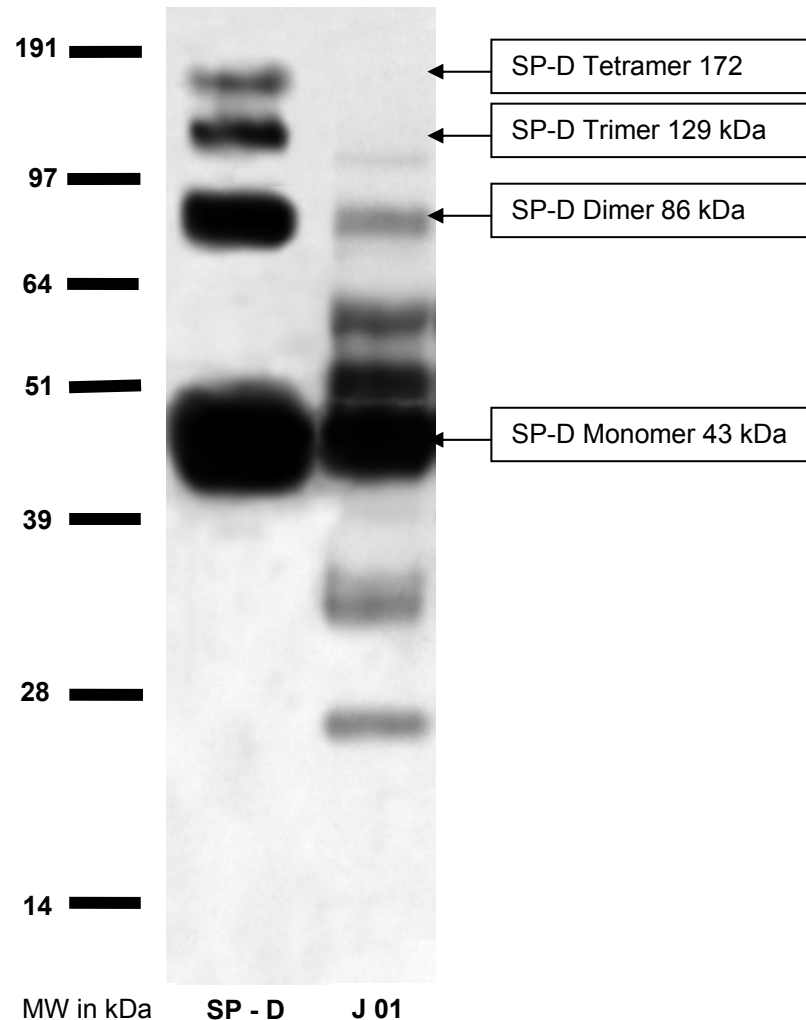


Abb. III.E.1.1.7.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 in NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Standard wurde gereinigtes SP-D und als Molekulargewichtsmarker SeeBlue® Plus2 verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit monoklonalem SP-D Antikörper von BMA Biomedicals AG inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter, polyklonaler Goat Anti-Rabbit IgG verwendet.

Bei dem Patienten J01 konnte mit dem Antikörper gegen SP-D normal prozessiertes SP-D in der monomeren und dimeren Form nachgewiesen werden. Des Weiteren waren unspezifische Bindungen mit niedrigerem Molekulargewicht und zwischen der monomeren und dimeren Form zu erkennen, welche auf Verunreinigungen im 2. Antikörper zurückzuführen sind.

III.E.1.2. Charakterisierung der Surfactantproteine mittels 2D Gelelektrophorese

III.E.1.2.1. Identifizierung einzelner Spots mittels Massenspektrometrie

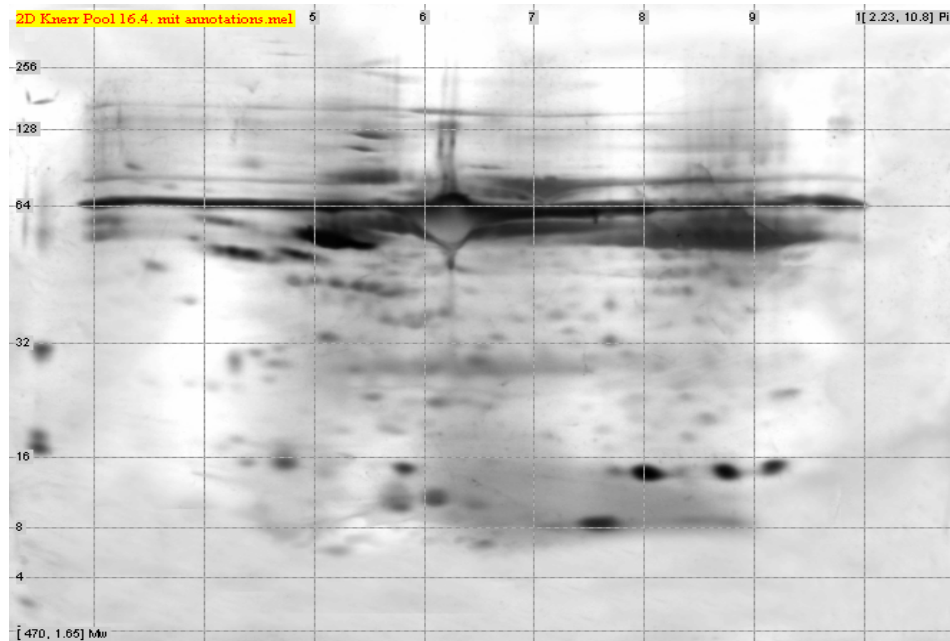


Abb. III.E.1.2.1.1.: 2 dimensionale Gelelektrophorese von 80 µg des Pools des Patienten J01, anschließend silbergefärbt nach Heukeshoven. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

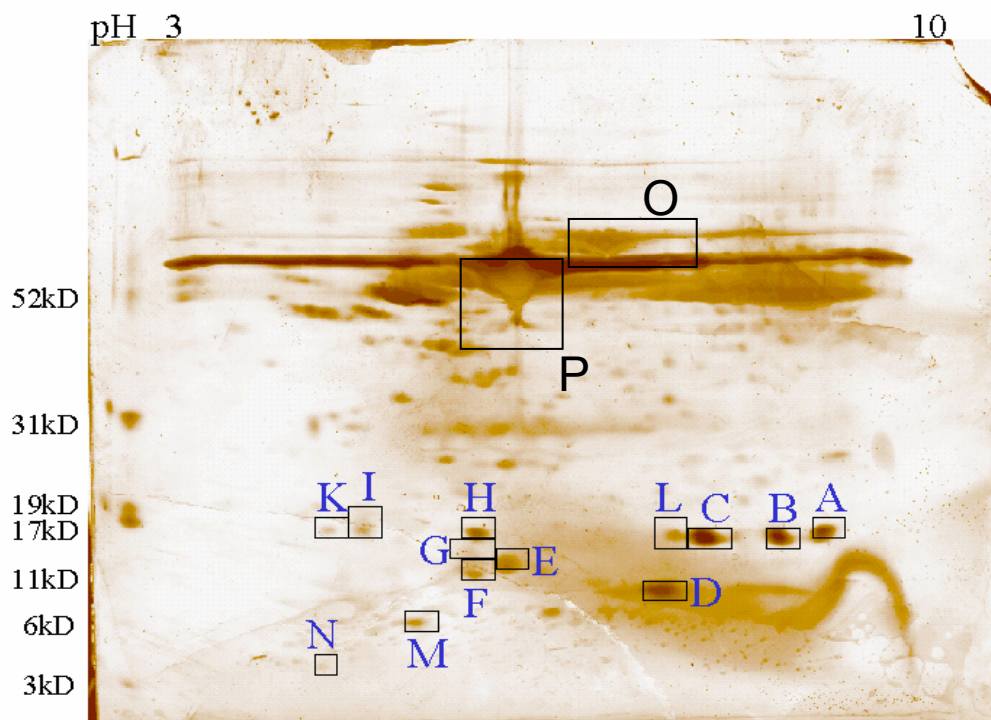


Abb. III.E.1.2.1.2.: 2 dimensionale Gelelektrophorese von 80 µg des Pools des Patienten J01, anschließend silbergefärbt nach Heukeshoven. Die markierten Abschnitte wurden für Massenspektrometrie ausgeschnitten. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Die mit A bis P bezeichneten Spots des Gels wurden ausgeschnitten und dann mit Hilfe der Massenspektrometrie deren Peptidsequenz bestimmt. Anhand von Proteindatenbanken wurde von den einzelnen Teilsequenzen auf die gefundenen Proteine geschlossen.

Tab.: III.E.1.2.1.1.: Durch Massenspektrometrie identifizierte Spots

Spot	Protein	Isoelektrischer Punkt	Molekulargewicht (kDa)
A	Hämoglobin alpha Kette	8,7	15,3
B	Hämoglobin alpha Kette	8,7	15,3
C	Hämoglobin beta Kette	6,8	16,09
D	Calgranulin A	6,5	10,87
E	Calgranulin B	5,7	13,28
F	Calgranulin B	5,7	13,28
G	Keine Identifizierung möglich		
H	Transthyretin Präcursor	5,5	15,98
I	Keine Identifizierung möglich		
K	Keine Identifizierung möglich		
L	Keine Identifizierung möglich		
M	Keine Identifizierung möglich		
N	Fragment des Clara cell Präcursor	5,0	5,7
O	Transferrin	6,13-6,51	84,8-74,3
P	Serumalbumin	5,58-7,24	50-70

Neben der Massenspektrometrie wurde mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot die Surfactantproteine und deren Proformen nachgewiesen.

III.E.1.2.2. SP-A

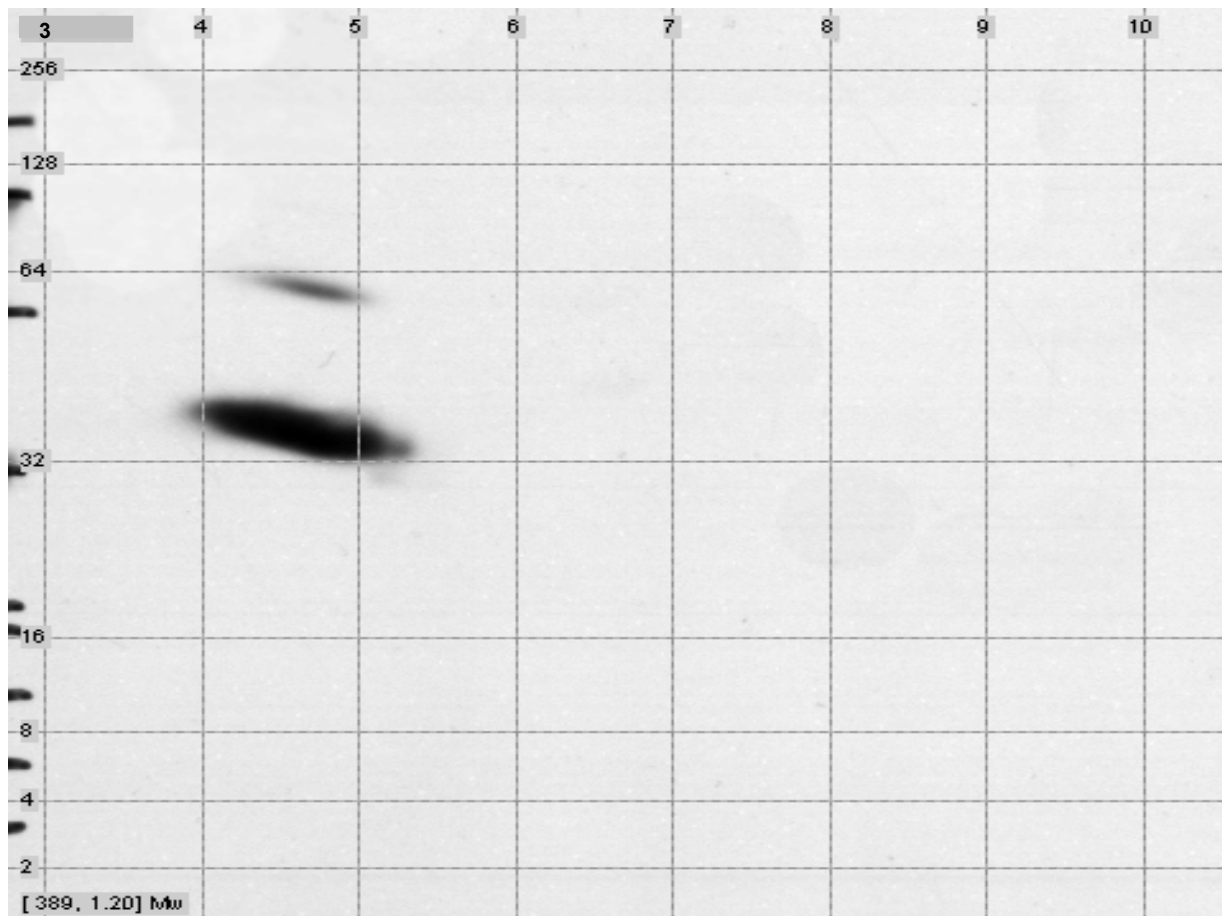


Abb. III.E.1.2.2.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit SP-A Antikörper von Altana inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Bei Patient J01 konnte die monomere und die dimere Form des SP-A im isoelektrischen Bereich von 3,5 bis 5,5 nachgewiesen werden. Trotz der Reduktion des IEF Streifens kam es zu keiner vollständigen Reduktion des SP-A.

III.E.1.2.3. Pro SP-B

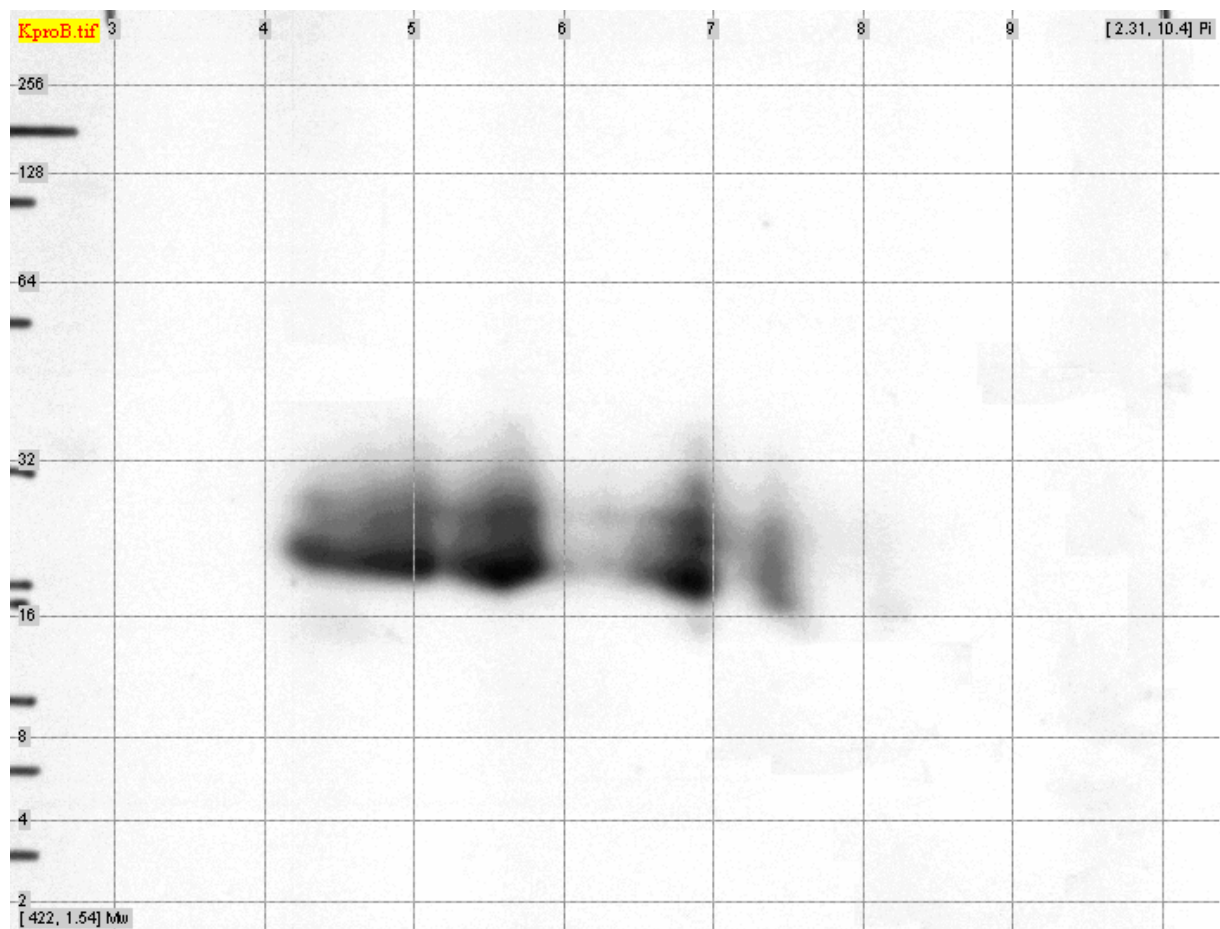


Abb. III.E.1.2.3.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit CtermB Antikörper inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Die Proform des Surfactantprotein B konnte im Bereich von 16 bis 32 und den isoelektrischen Punkten 4 bis 8 detektiert werden.

III.E.1.2.4. SP-B

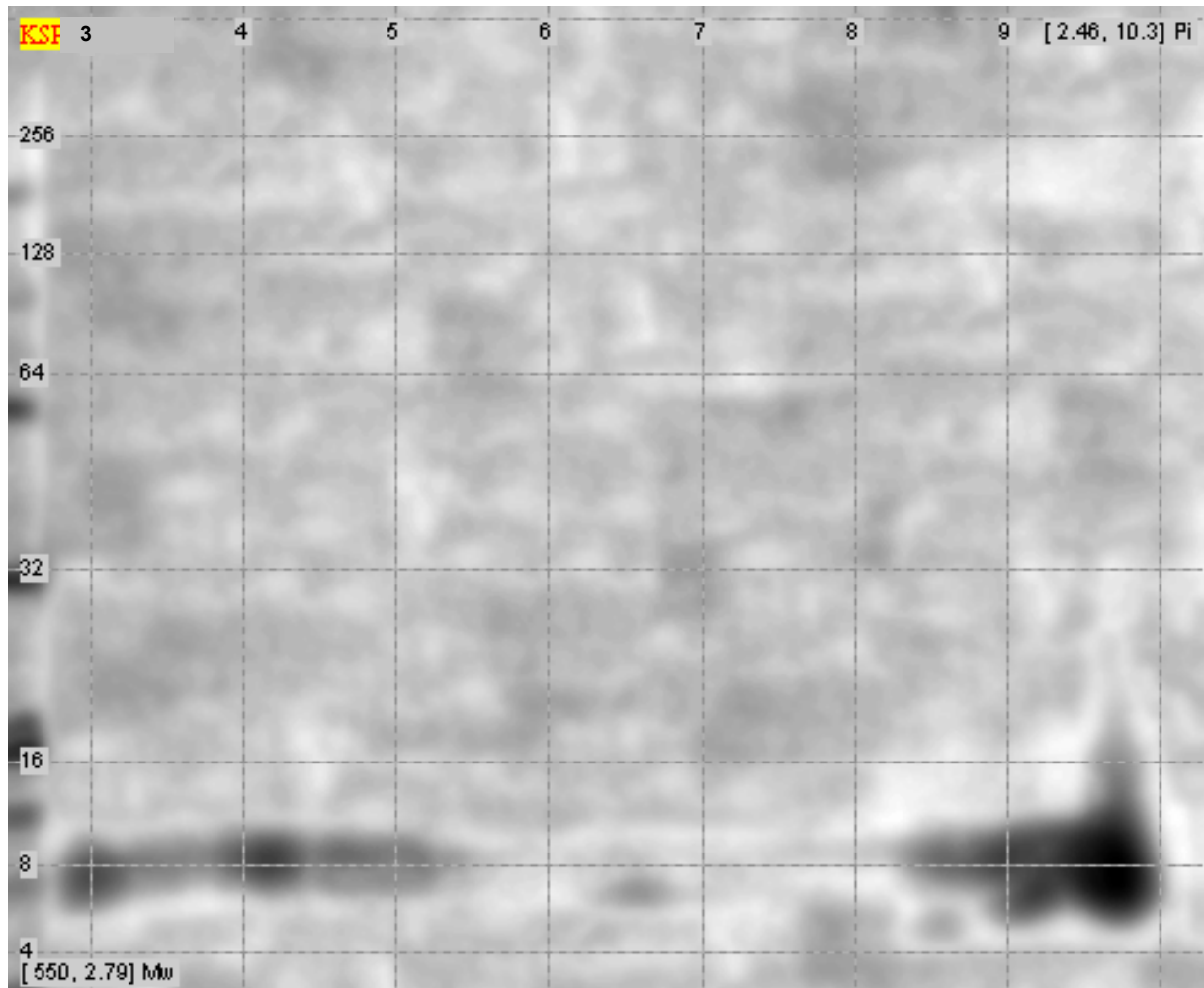


Abb. III.E.1.2.4.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit SP-B Antikörper inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

SP-B konnte bei einem Molekulargewicht von 8 kDa nachgewiesen werden. Allerdings gelang es nicht, das Protein bei einem bestimmten pH Wert zu fokussieren, was wahrscheinlich an den hydrophoben Eigenschaften des Proteins liegt.

III.E.1.2.5. pro SP-C (Beers)

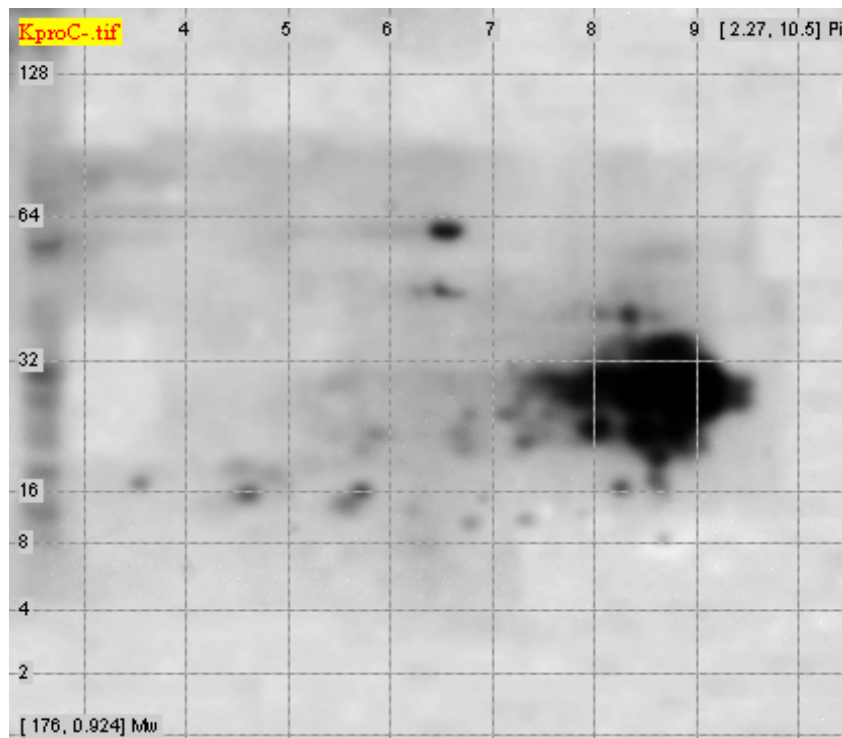


Abb. III.E.1.2.5.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit pro SP-C Antikörper von Beers inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

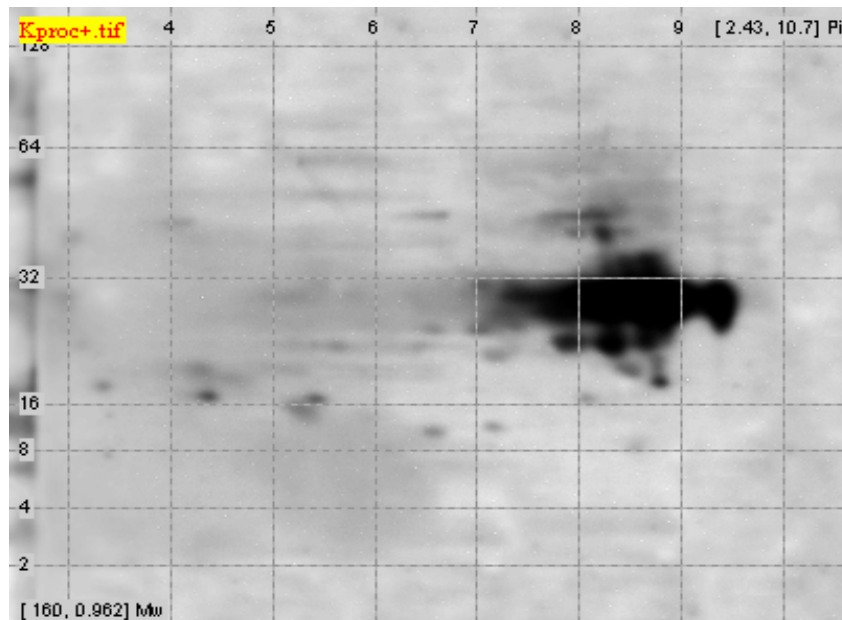


Abb. III.E.1.2.5.2.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit pro SP-C Antikörper von Beers inkubiert, der vorher spezifisch mit dem komplementären Peptid blockiert wurde. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben

Die Detektion der Proform von SP-C ergab kein eindeutiges Ergebnis. Die Detektion zeigte einen Bereich von IEP 7 bis 9,5 und 30 kDa. Eine Blockierung des Antikörpers mit dem Peptid war nicht möglich.

III.E.1.2.6. pro SP-C (Whitsett)

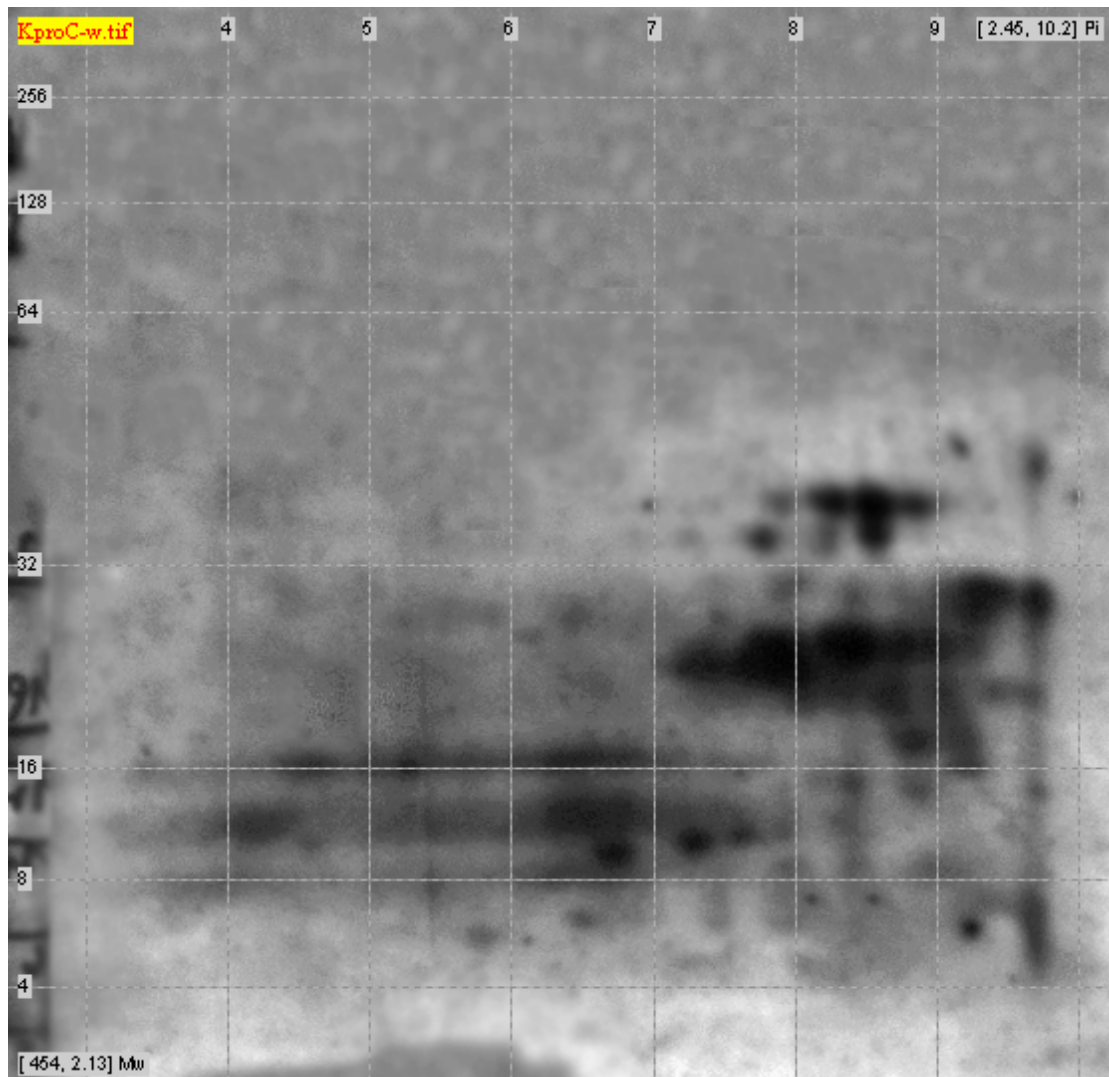


Abb. III.E.1.2.6.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit pro SP-C Antikörper von Whitsett inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben

Die Detektion mit dem anderen Antikörper gegen pro SP-C von Whitsett zeigte ein ähnliches Bild wie mit dem Antikörper von Beers. Es konnte keine ausreichende Fokussierung erreicht werden.

III.E.1.2.7. SP-C

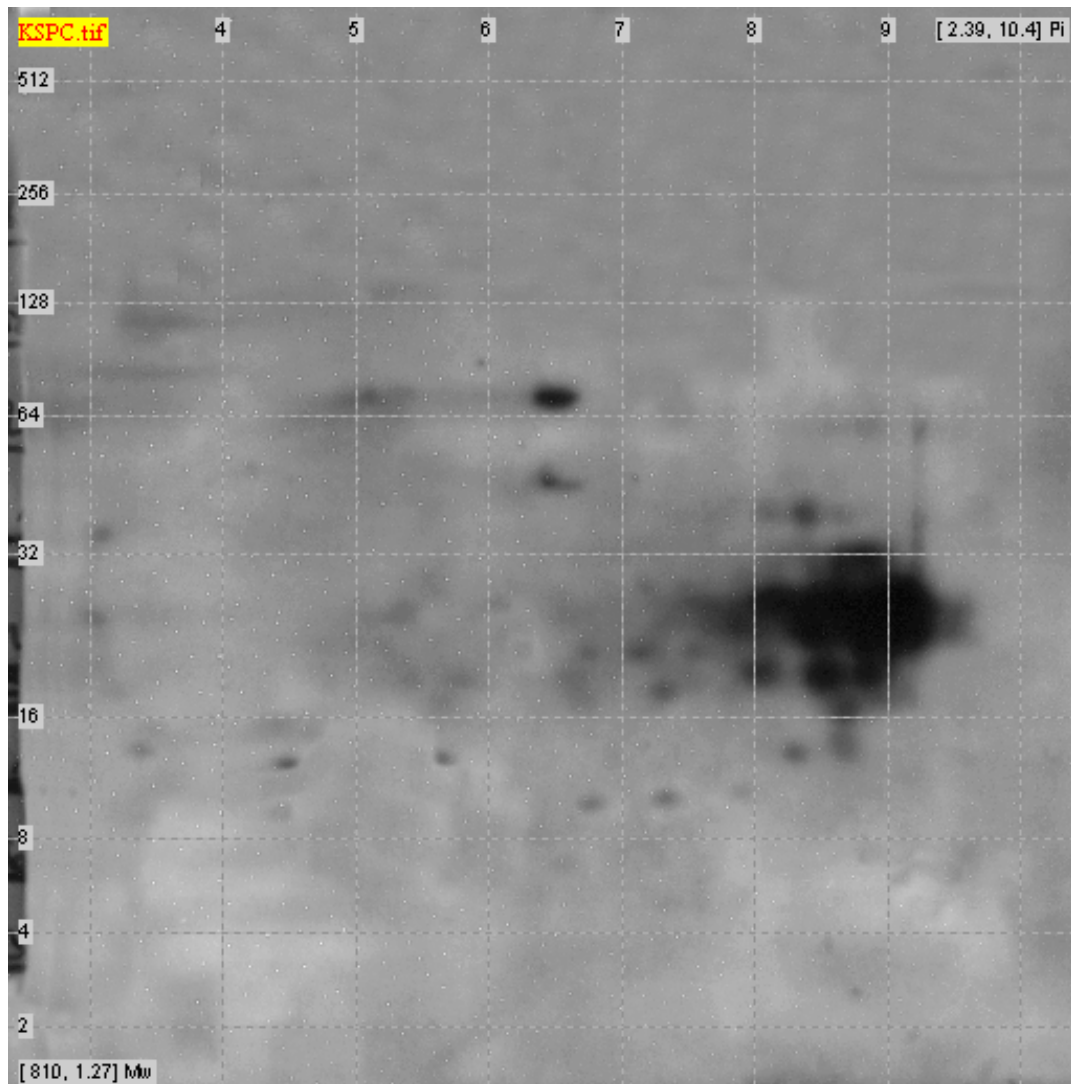


Abb. III.E.1.2.7.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit SP-C Antikörper inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben

Die Detektion von SP-C zeigte ein ähnliches Bild, wie mit den pro SP-C Antikörpern.

III.E.1.2.8. SP-D

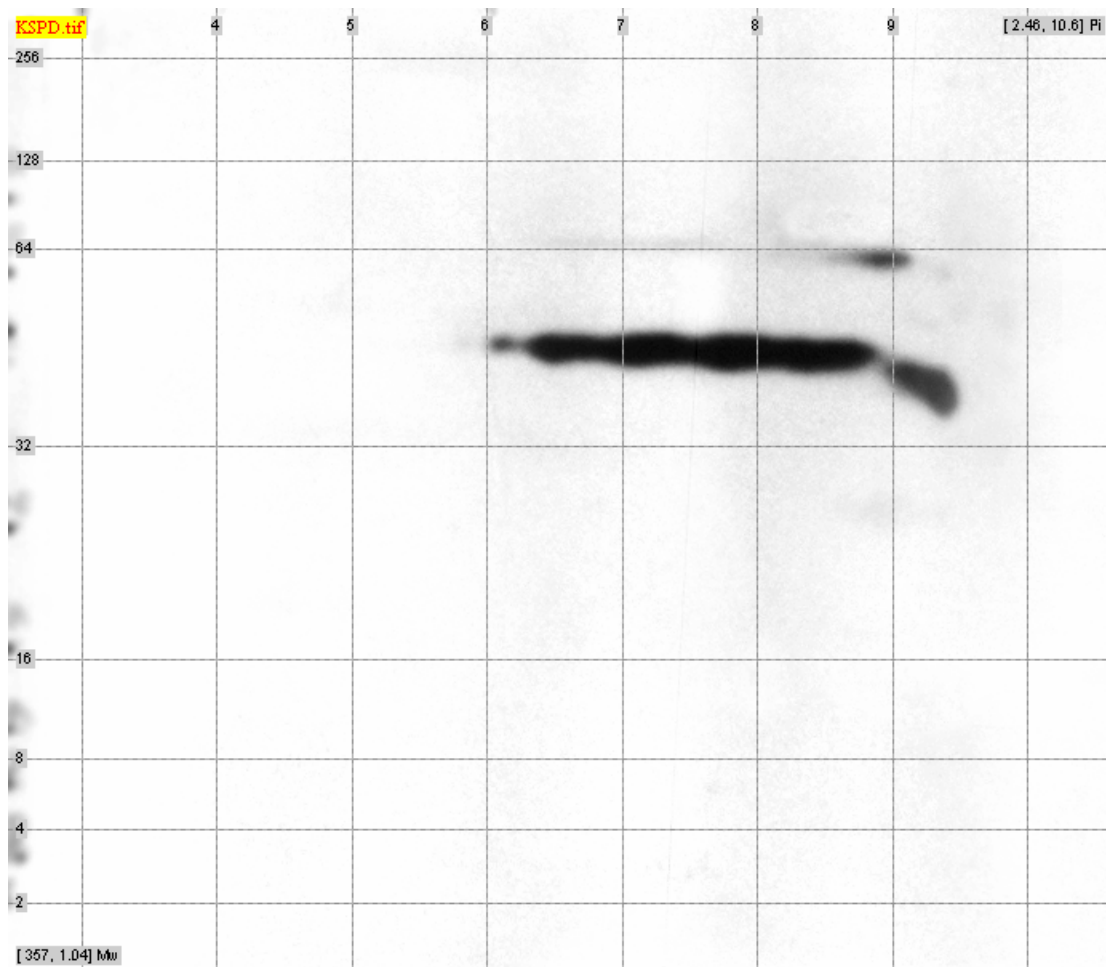


Abb. III.E.1.2.8.1.: Auftrennung von 80 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran mit SP-D Antikörper inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

Es konnte SP-D bei einem Molekulargewicht von 43 kDa und zwischen den isoelektrischen Punkten 5 bis 9,5 nachgewiesen werden.

III.E.1.2.9. Zweiter Antikörper (goat α rabbit)

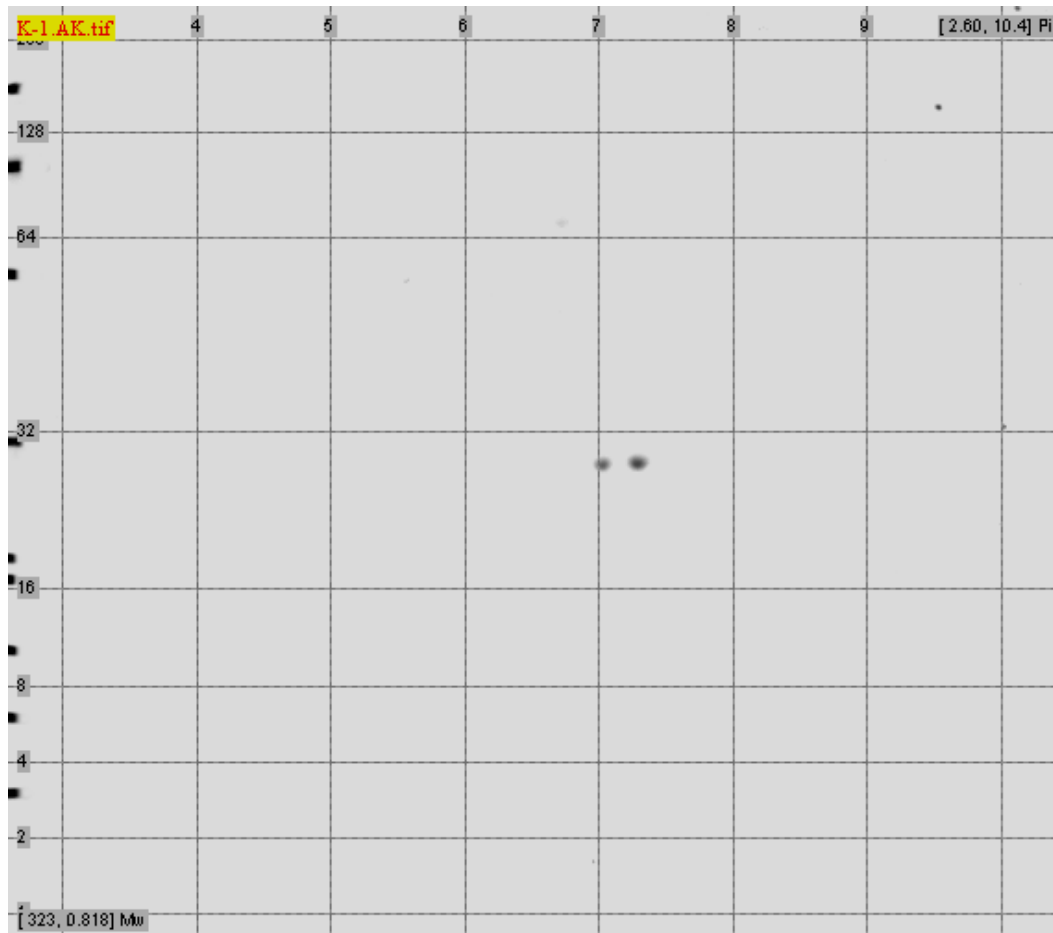
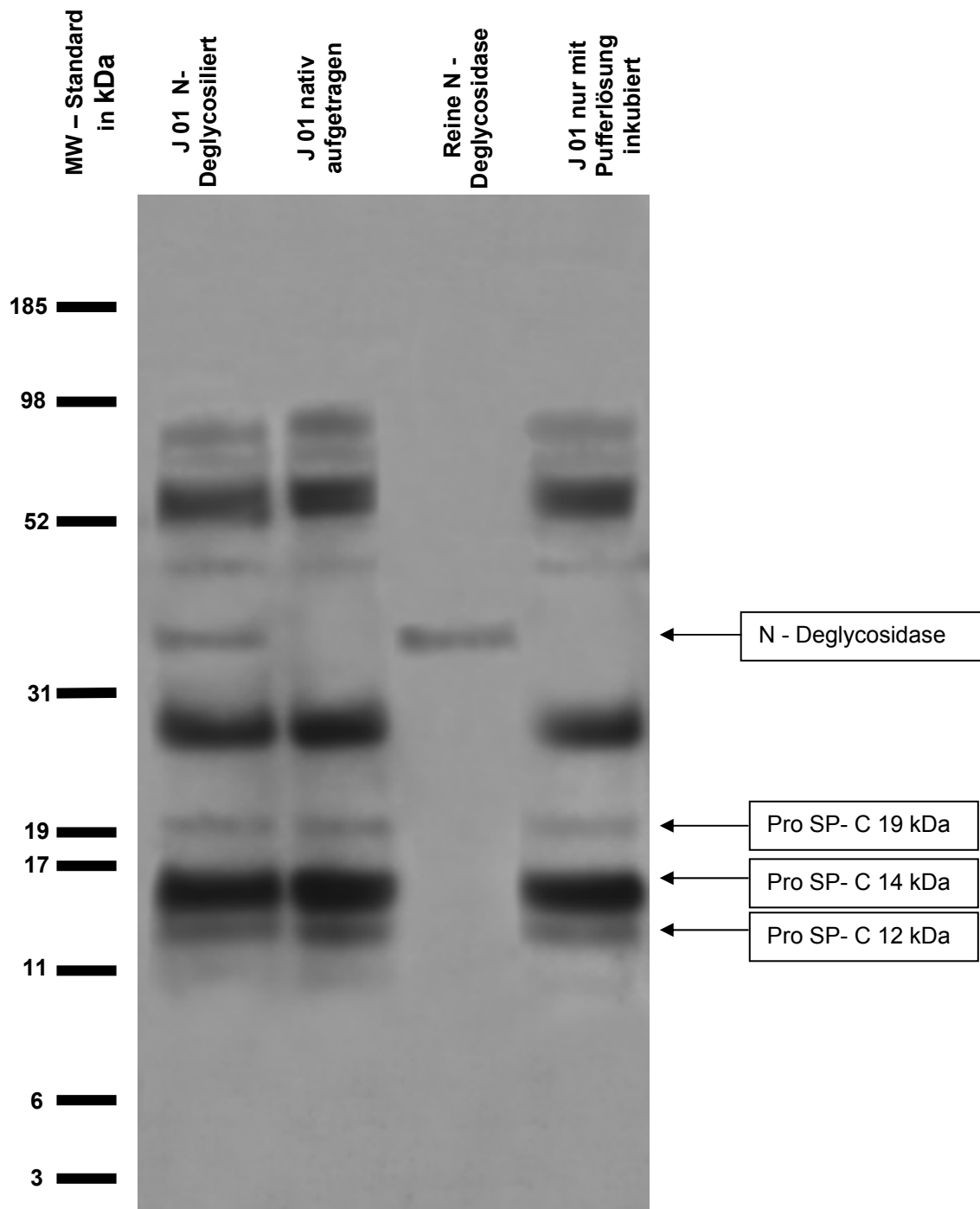


Abb. III.E.1.2.9.1.: Auftrennung von 80 μ g Gesamtprotein des Pools des Patienten J01 vom 13.12.1999 mit Hilfe der 2D Gelelektrophorese. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit dem 2. Antikörper goat anti rabbit Fab gereinigt inkubiert. Horizontal sind die pH Werte des isoelektrischen Fokussierungstreifens und vertikal das Molekulargewicht in Kilodalton angegeben.

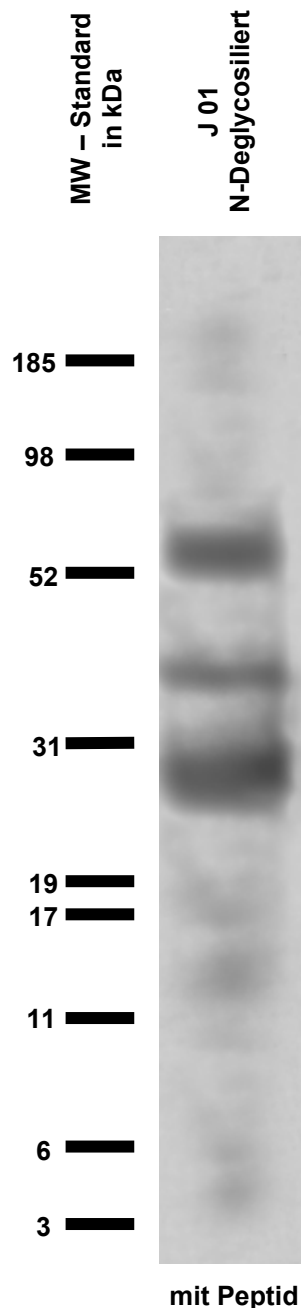
Die Inkubation des Blots nur mit dem 2. Antikörper zeigte keine unspezifischen Bindungen.

III.E.1.3. Glycosilierungsmuster
III.E.1.3.1. N - Deglycosidase
III.E.1.3.1.1. Pro SP-C



III.E.1.3.1.1.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 vom 1.10.2001 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 4 Units N-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

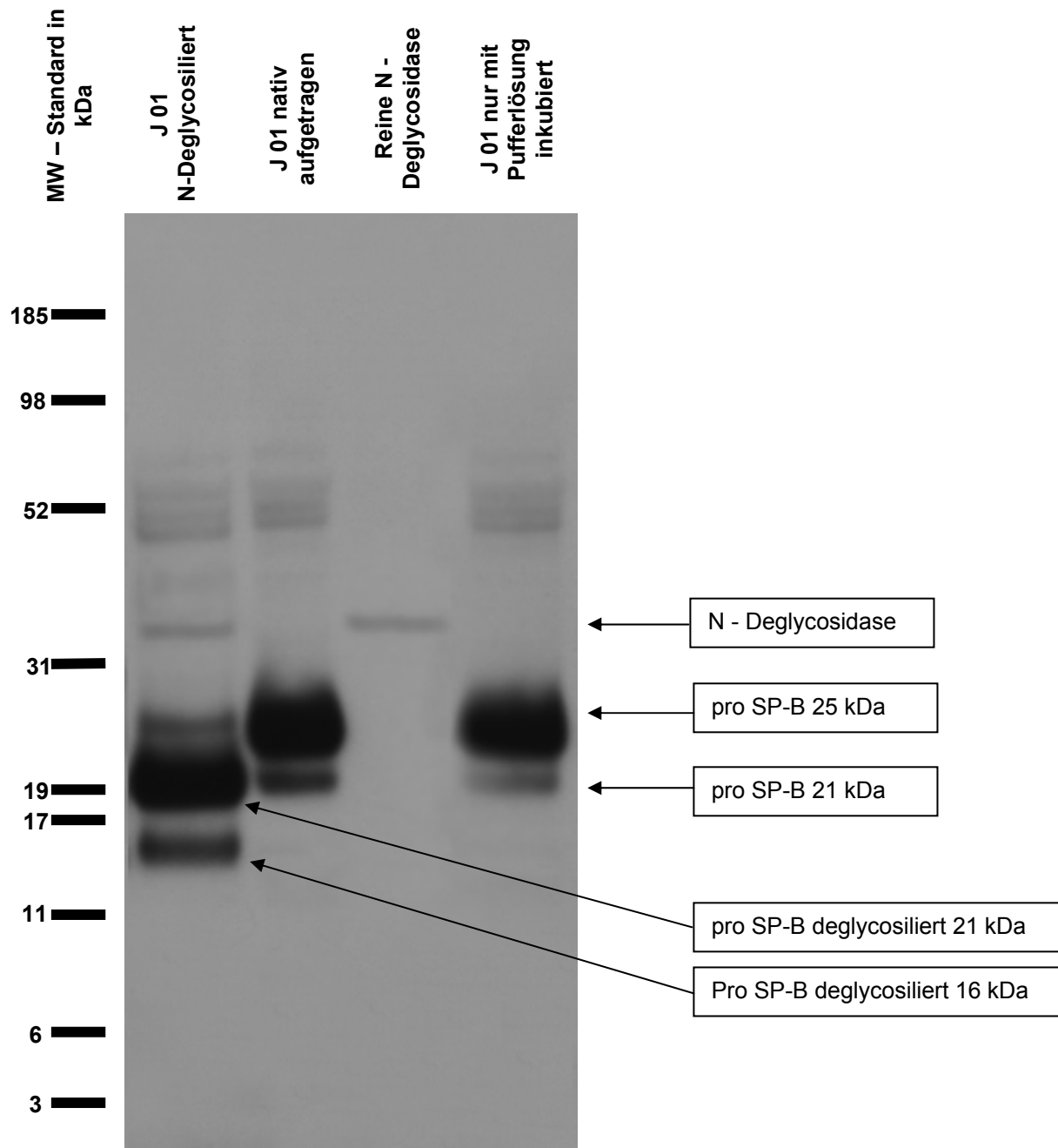
Die Inkubation der Probe mit N – Deglycosidase führte zu keiner Veränderung der Bandenlage und Bandenintensität im Vergleich zu dem Bild ohne das Enzym. Die Inkubation nur mit der Pufferlösung ergab ebenfalls keine Veränderung. Die N – Deglycosidase zeigte eine eigene Bande bei ca. 39 kDa.



III.E.1.3.1.1.2.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 vom 1.10.2001 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 4 Units N-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit NProSPC-C10-23 Antikörper mit Peptid inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die selektive Blockierung des Antikörpers mit Peptid führte zum Verschwinden der Banden, was die Selektivität des Antikörpers bestätigt.

III.E.1.3.1.2. Pro SP-B

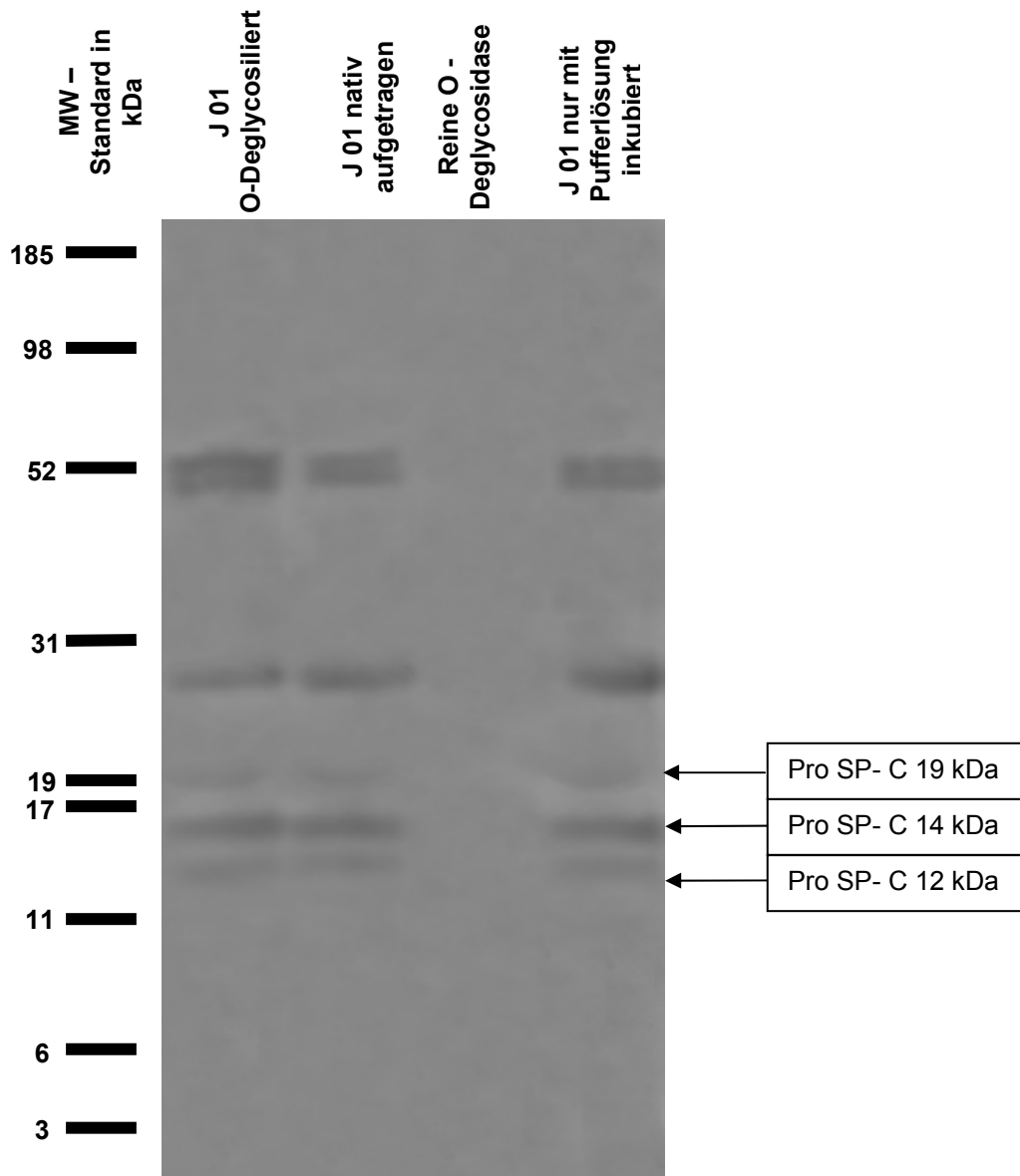


III.E.1.3.1.2.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 vom 1.10.2001 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 4 Units N-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit CtermB Antikörper inkubiert. Der pro SP-B Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von S. Guttenberg. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Inkubation der Probe mit N – Deglycosidase führte zu einer Verringerung des Molekulargewichts der beiden pro SP-B Banden. Die 25 kDa Bande wurde auf 21 kDa verringert und die 21 kDa Bande reduzierte sich auf 16 kDa. Die Inkubation mit reiner Pufferlösung hatte keinen Einfluß auf die Molekulargewichte.

III.E.1.3.2. O – Deglycosidase

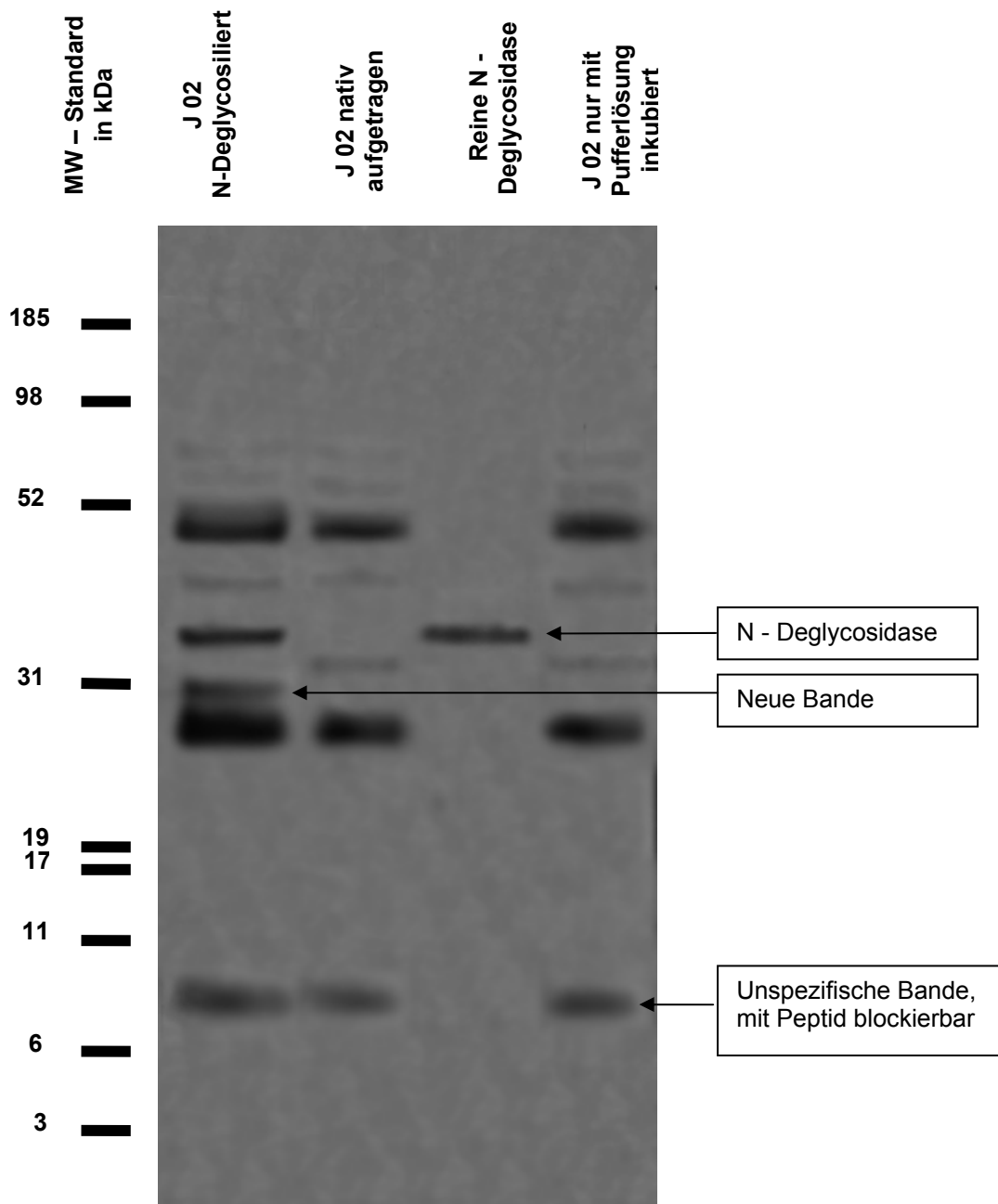
III.E.1.3.2.1. Pro SP-C



III.E.1.3.2.1.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J01 vom 1.10.2001 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 2,5 mUnits O-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Inkubation der Probe mit O–Deglycosidase zeigt keine Änderung der Bandenlage oder -intensität, die reine Inkubation mit Pufferlösung zeigte keinen Effekt.

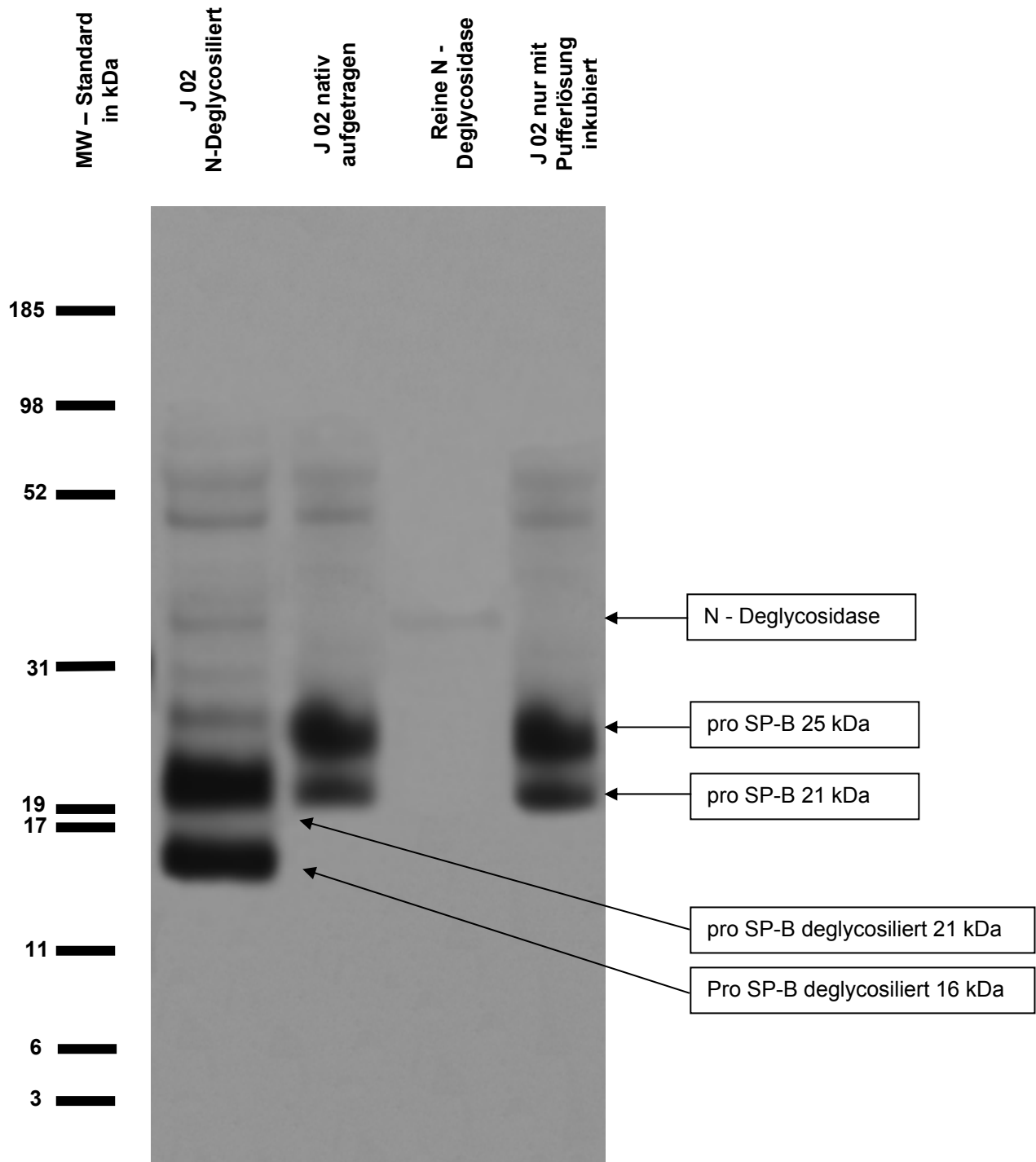
III.E.2. Patient J02
III.E.2.1. Glycosilierungsmuster
III.E.2.1.1. N – Deglycosidase
III.E.2.1.1.1. Pro SP-C



III.E.2.1.1.1.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J02 vom 8.8.2002 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 4 Units N-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Inkubation der Probe mit N – Deglycosidase zeigte, ebenso wie bei dem Patienten J01, keine Veränderungen des pro SP-C.

III.E.2.1.1.2. Pro SP-B



III.E.2.1.1.2.1.: Auftrennung von 5 µg Gesamtprotein nativer Lavage J02 vom 8.8.2002 auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Probe wurde 10 h in Puffer 20 mM Na₂PO₄ mit 4 Units N-Deglycosidase inkubiert. Die Probe wurde denaturiert und reduziert aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran nur mit CtermB Antikörper inkubiert. Der pro SP-B Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von S. Guttenberg. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Die Inkubation der Probe mit N – Deglycosidase führte, ebenso wie bei Patient J01, zu einer Verringerung des Molekulargewichts der beiden pro SP-B Banden. Die 25 kDa Bande wurde auf 21 kDa verringert und die 21 kDa Bande reduzierte sich auf 16 kDa. Die Inkubation mit reiner Pufferlösung hatte keinen Einfluß auf die Molekulargewichte.

III.F. Variabilität der Surfactantproteine über die Zeit

III.F.1. Patient J01

III.F.1.1. Variabilität des SP-C über die Zeit

Es wurde untersucht, ob sich Konzentration und Darstellung von SP-C im 1 D Gel über die Zeit verändern. Dazu wurde der Pool der rechten Lungenseite zu 7 verschiedenen Zeitpunkten, die sich über einen Zeitraum von 2 Jahren erstreckten, aufgetragen.

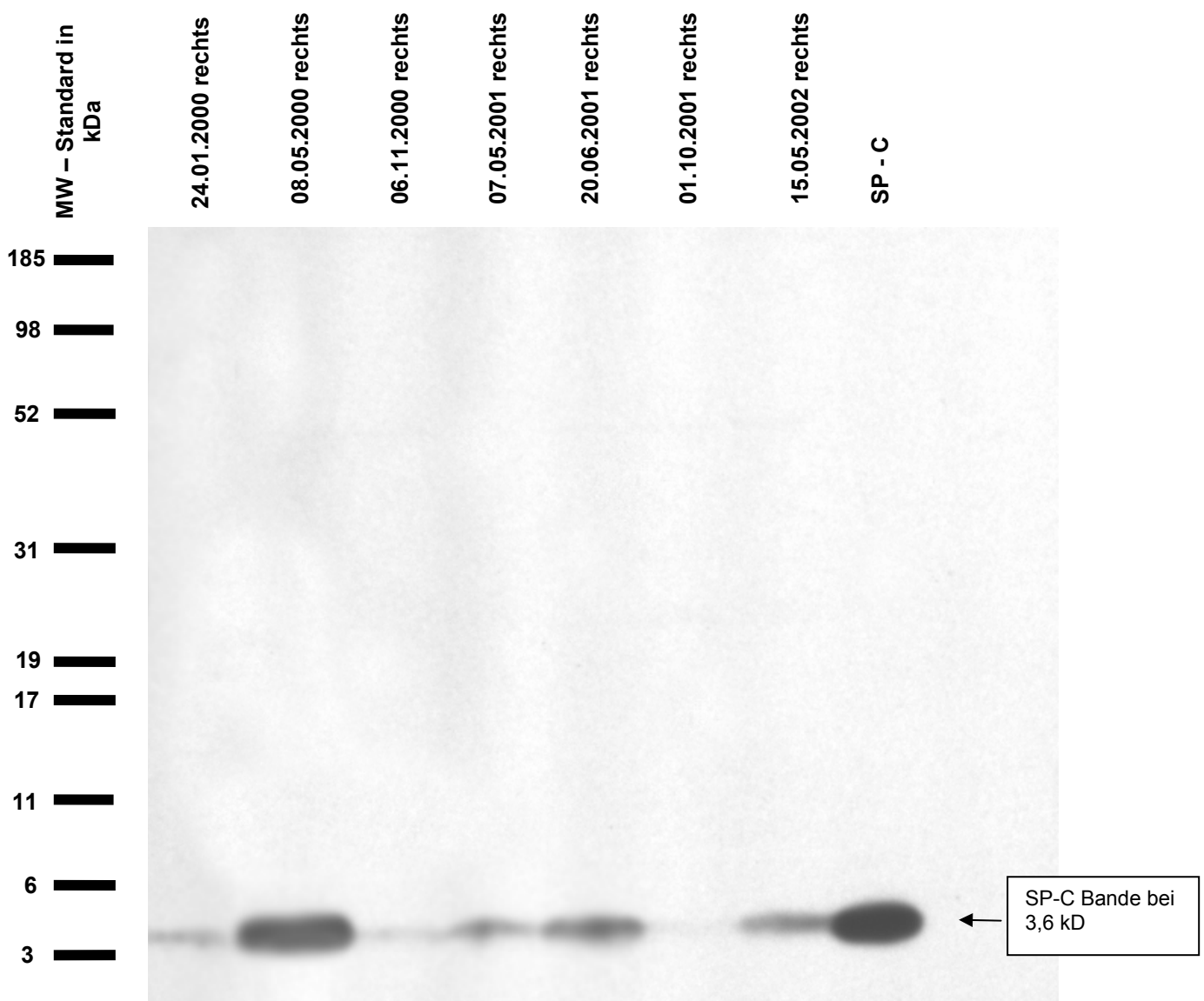


Abb. III.F.1.1.1.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J 01 zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Bei Patient J01 lassen sich große Variabilitäten in der Menge an SP-C über die Zeit erkennen. Es zeigen sich große Unterschiede in der Quantität der Expression von SP-C.

III.F.1.2. Variabilität des pro SP-C über die Zeit

Durch eine Genmutation (I73T) des SP-C Gens zeigen sich bei Patient J01 drei verschiedene Proformen von SP-C. Es wurde untersucht, inwieweit deren Expression im Verlauf der Zeit variiert.

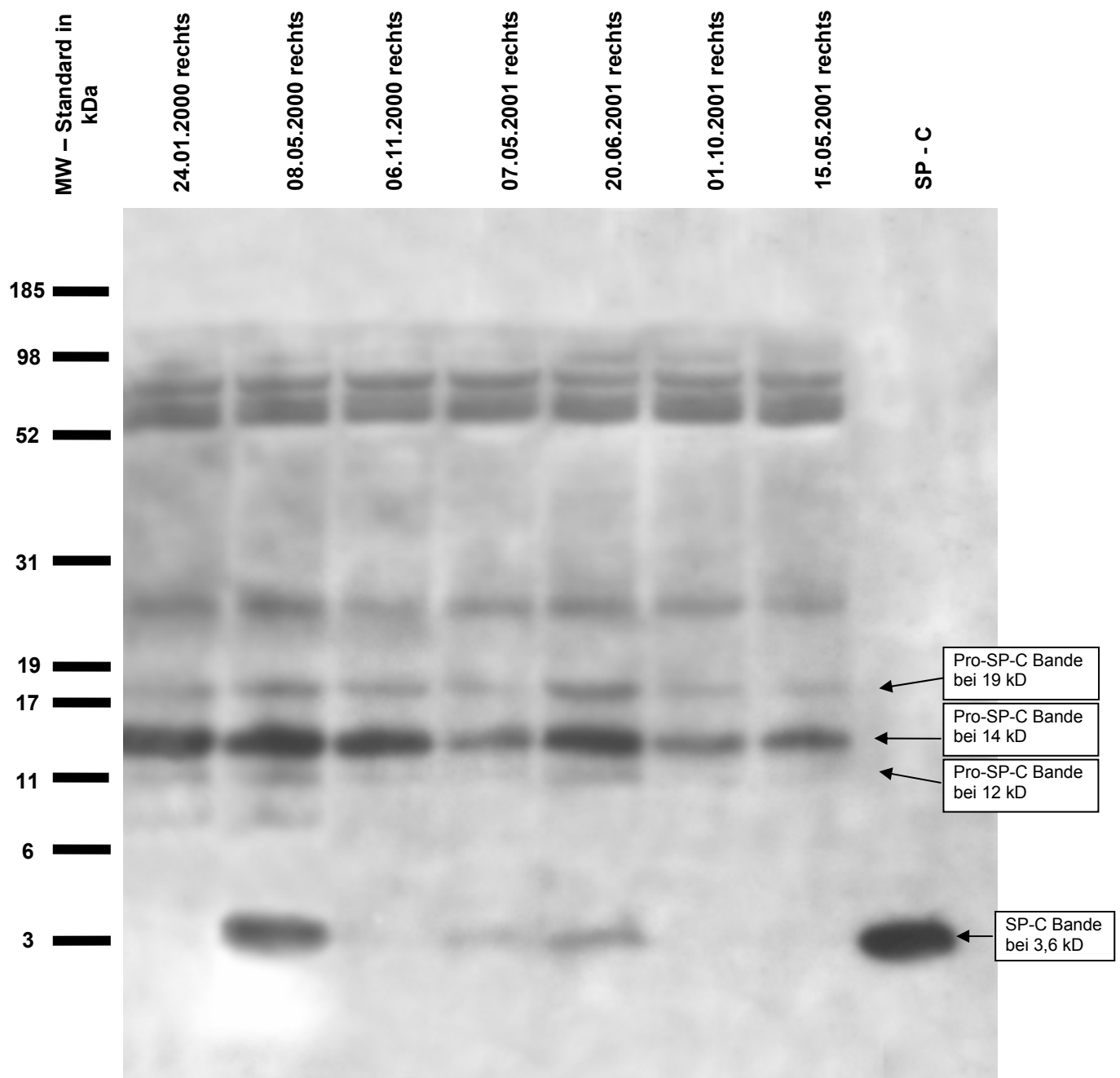


Abb. III.F.1.2.1.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J 01 zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet.

Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

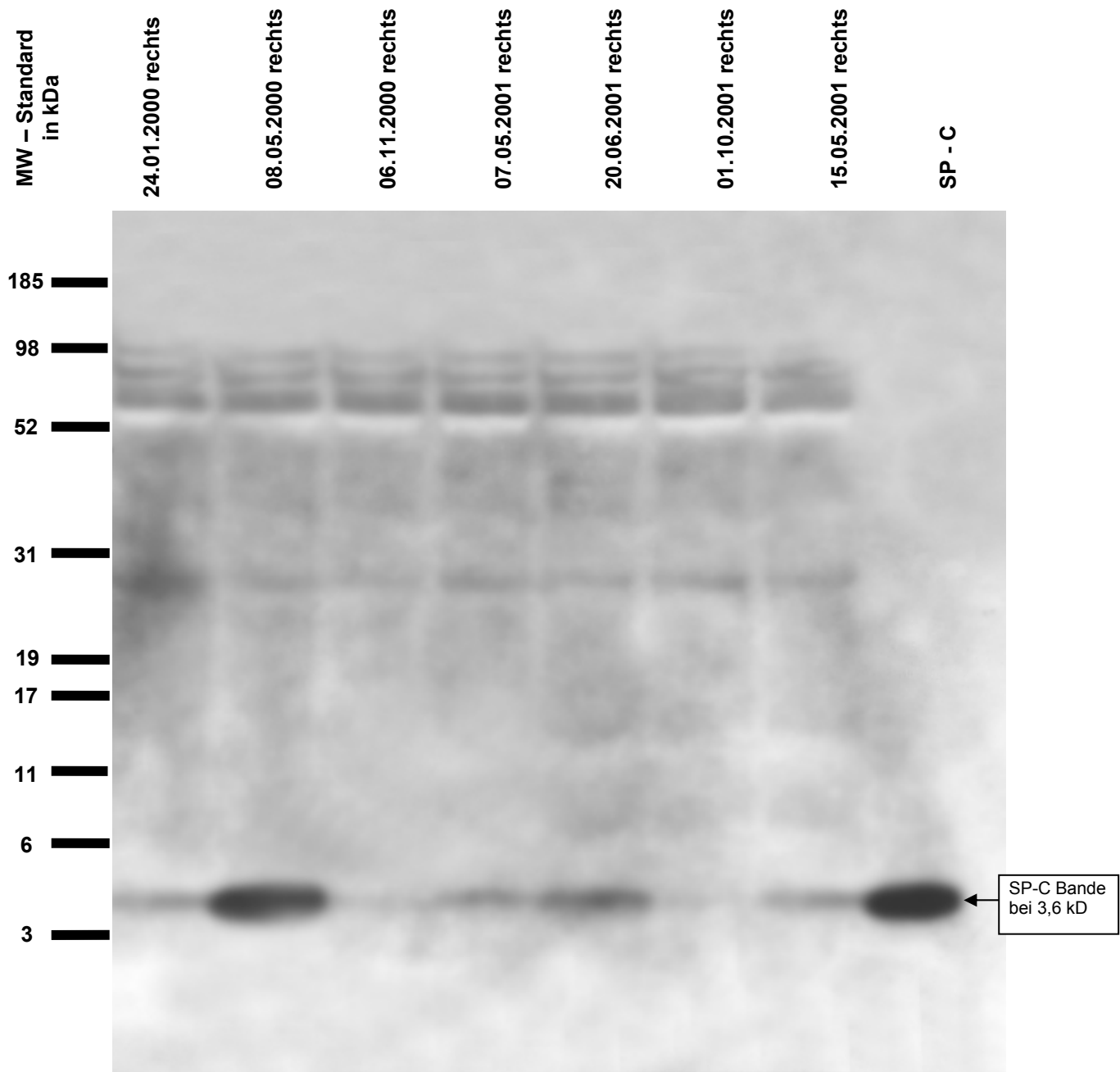


Abb. III.F.1.2.2.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J 01 zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert der vorher spezifisch mit dem korrespondierenden Peptid blockiert wurde. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde

Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

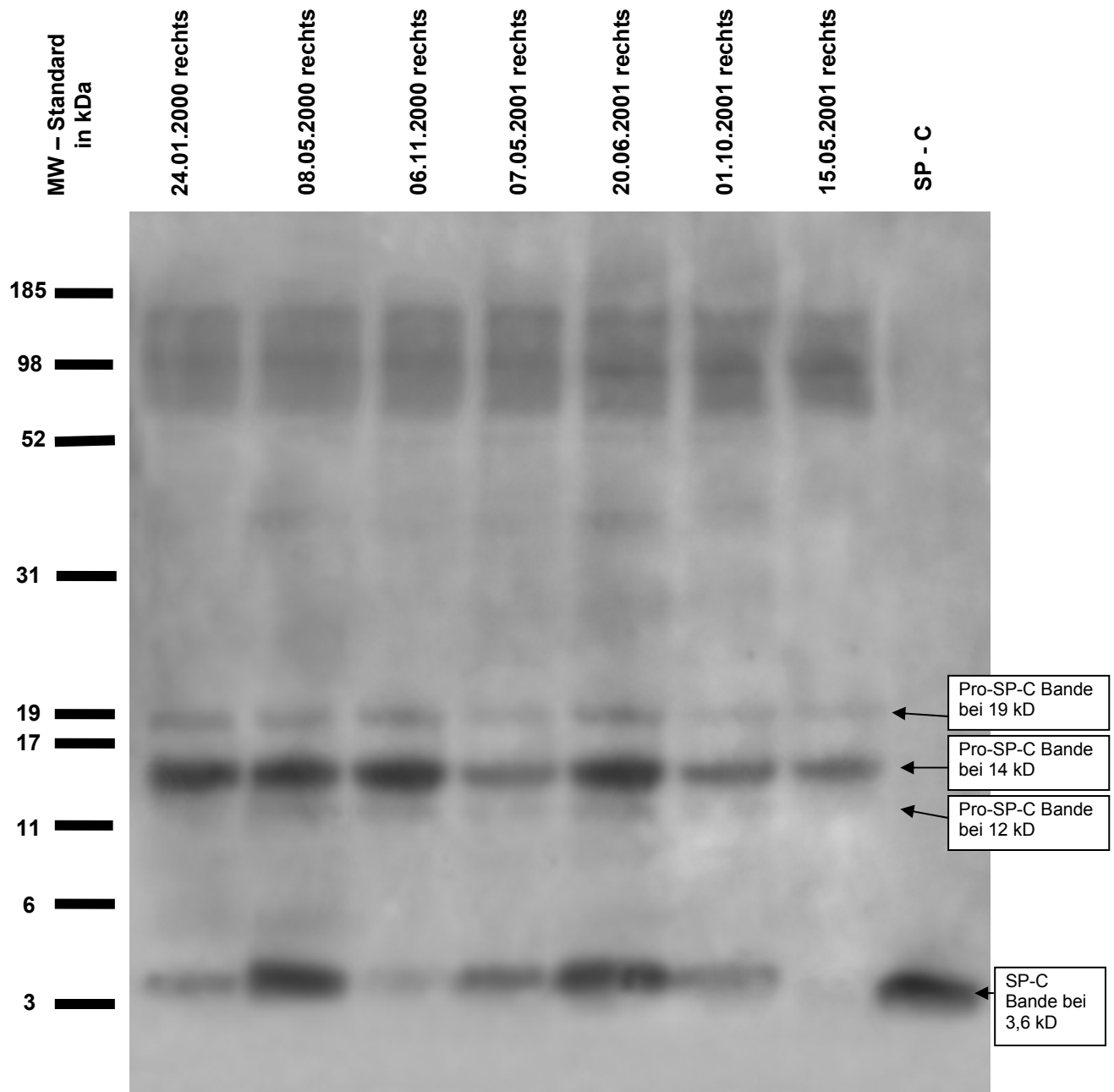


Abb. III.F.1.2.3.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J 01 zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher nicht reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von Byk Gulden. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

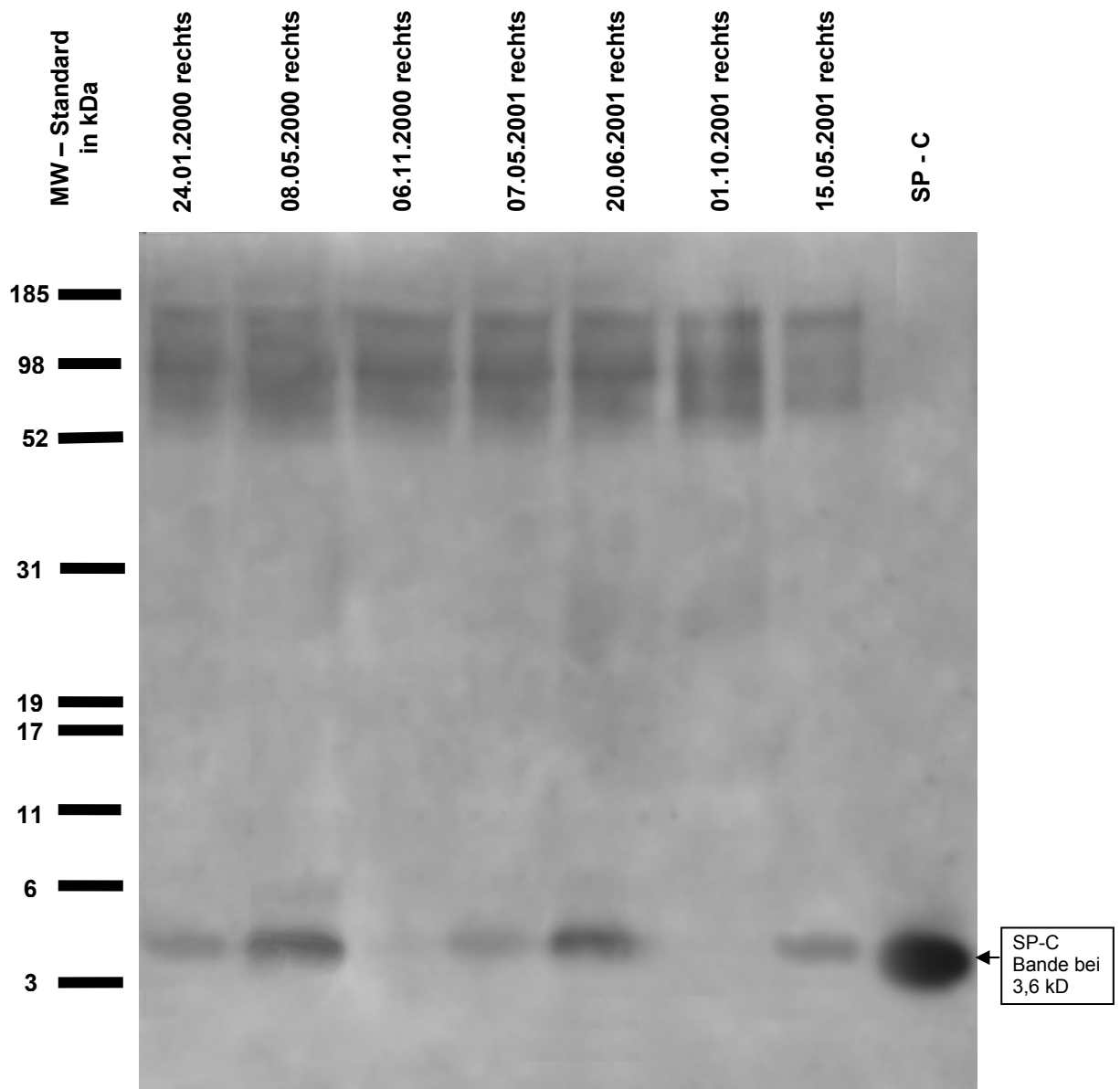


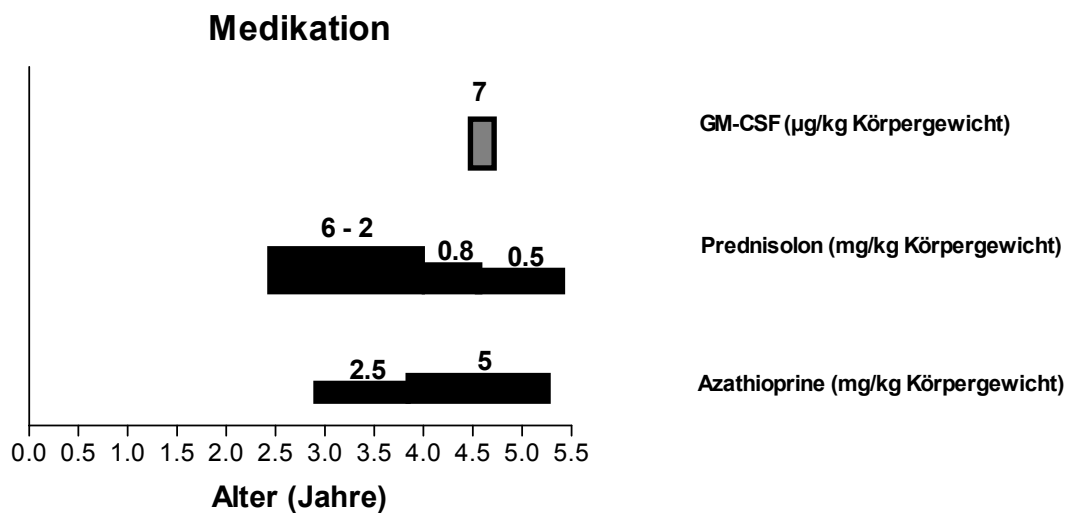
Abb. III.F.1.2.4.: Auftrennung von je 5 µg Gesamtprotein des Pools des Patienten J 01 zu verschiedenen Zeitpunkten auf einem NuPAGE® Bis-Tris 10% Gel. Die Proben wurden vorher nicht reduziert. Als Molekulargewichtsmarker wurde MultiMark® verwendet. Nach dem Blotten wurde die Membran erst einmal mit polyklonalem r-SP-C Antikörper vom Kaninchen von Byk Gulden inkubiert. Nach deren Auswertung wurden die Membranen mit NProSPC-C10-23 Antikörper inkubiert der vorher spezifisch mit dem korrespondierenden Peptid blockiert wurde. Der Antikörper ist polyklonal, vom Kaninchen und von M. Beers. Als zweiter Antikörper wurde Peroxidase konjugierter AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) verwendet.

Bei Patient J01 zeigt sich eine hohe Variabilität über die Zeit. In reduzierter und nicht reduzierter Darstellung zeigen sich bei den Proformen keine Unterschiede. Sämtliche

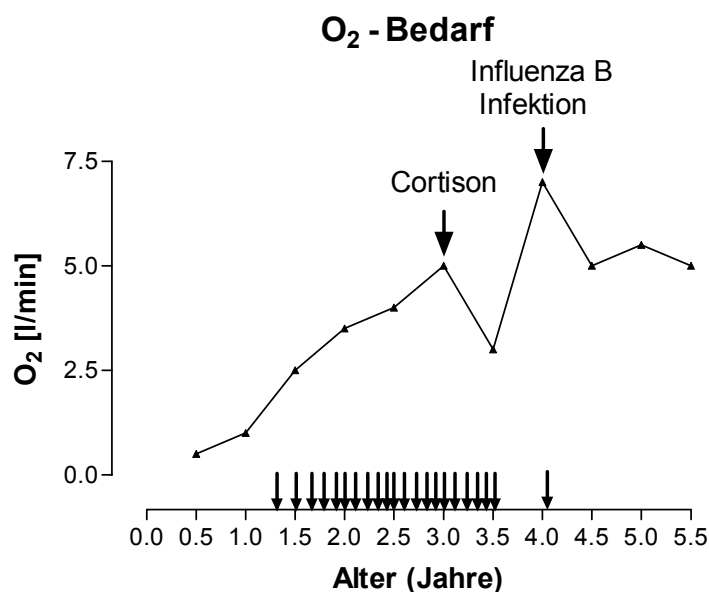
Proformen konnten in beiden Darstellungsweisen selektiv mit Peptid blockiert und somit die Selektivität des Antikörpers gezeigt werden.

III.F.1.3. Variabilität der Surfactantbestandteile über die Zeit

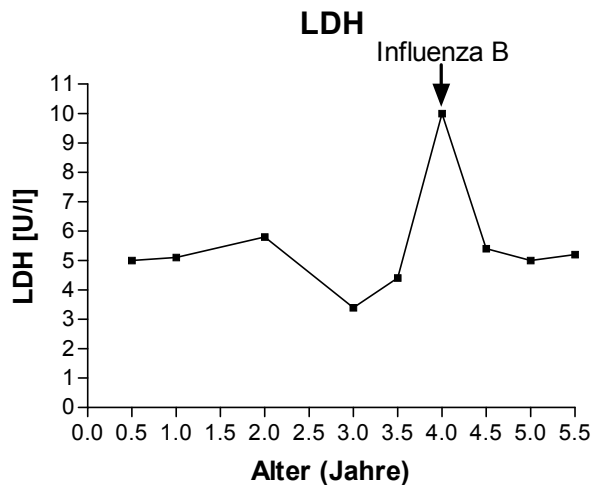
Der Patient J01 wurde über eine Dauer von 5 Jahren in unserer Klinik behandelt. Über diese Zeit wurden mehrere Lavagen durchgeführt. Im Folgenden sollen die verschiedenen gemessenen Lavagebestandteile mit der Medikation und einigen klinischen Parametern in Zusammenhang gebracht werden.



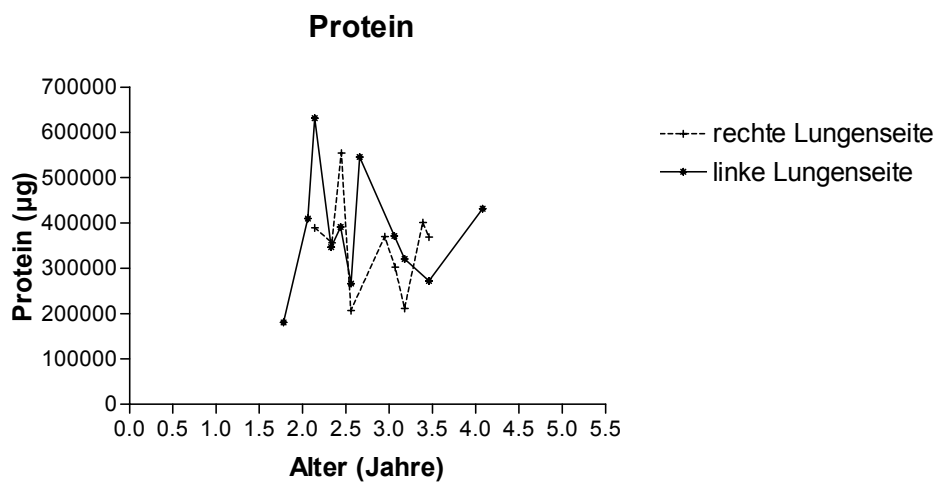
III.F.1.3.1.: Medikation des Patienten J01 ab dem 3. Lebensjahr.



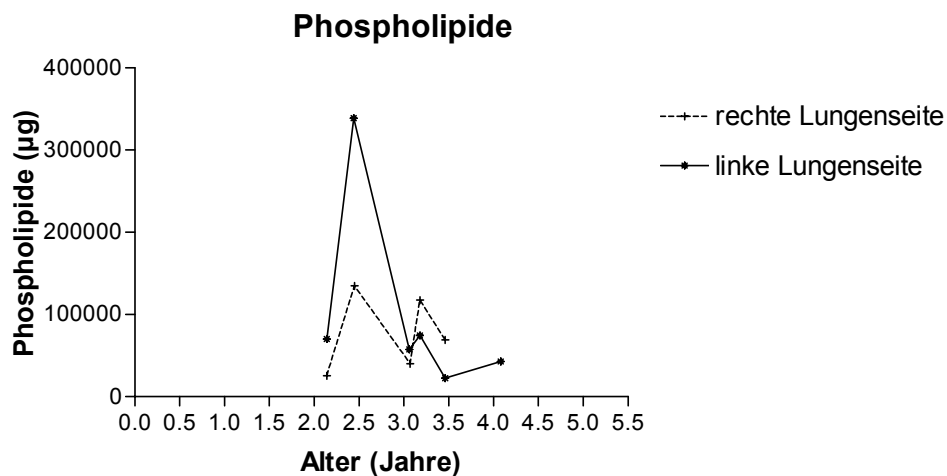
III.F.1.3.2.: Sauerstoffbedarf des Patienten J01 über 5,5 Jahre. Eingezeichnet ist eine Kortisonstoßtherapie und eine Infektion mit Influenza B. Jeder Pfeil entspricht einer durchgeführten Ganzlungenlavage.



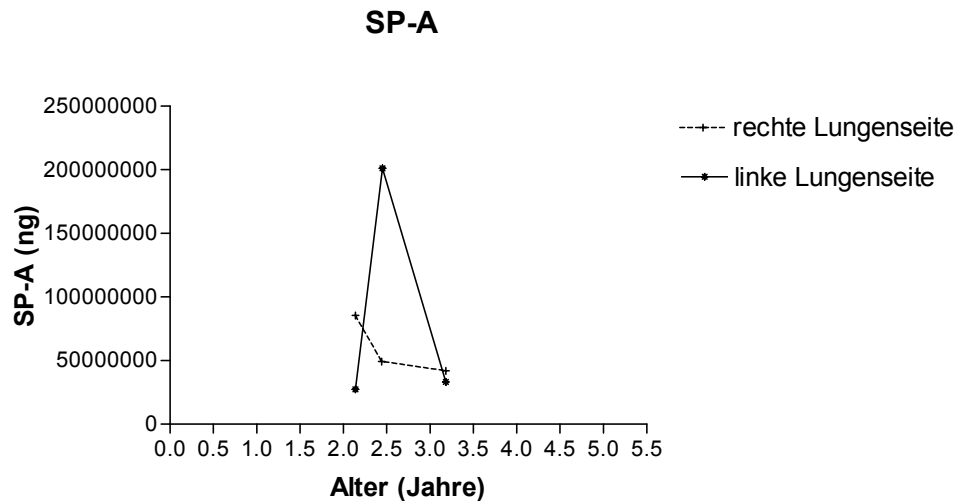
III.F.1.3.3.: LDH Konzentration im Serum des Patienten J01 über 5,5 Jahre. Eingezeichnet ist eine Infektion mit Influenza B.



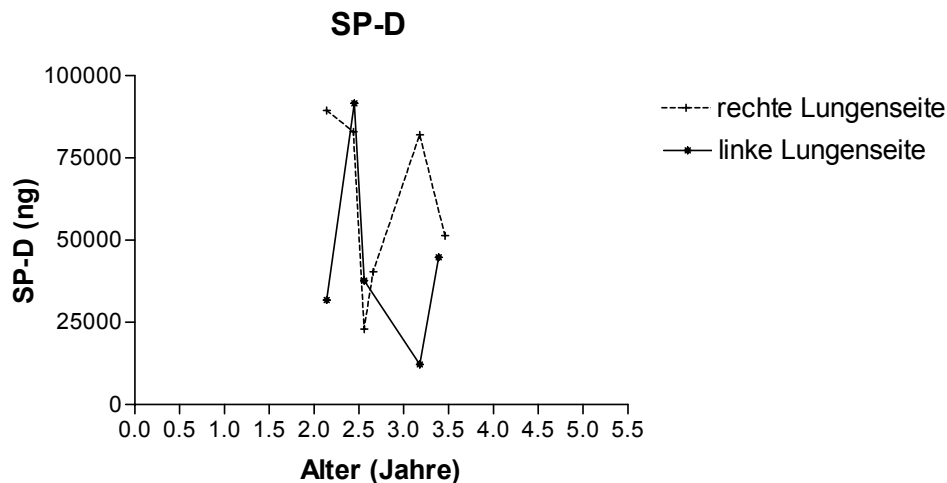
III.F.1.3.4.: Gesamtproteinmenge in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J01 über 5,5 Jahre in µg.



III.F.1.3.5.: Gesamtphospholipidmenge in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J01 über 5,5 Jahre in µg.



III.F.1.3.6.: Gesamtmenge an SP-A in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J01 über 5,5 Jahre in ng.



III.F.1.3.7.: Gesamtmenge an SP-D in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J01 über 5,5 Jahre in ng.

Der Verlauf des O₂ Verbrauchs zeigt im Wesentlichen einen kontinuierlichen Anstieg mit 2 Spitzenwerten, welche auf eine Senkung des O₂ Bedarfs nach einer Kortisonstoßtherapie und auf eine Infektion mit Influenza B zurückzuführen sind. Der O₂ Verbrauch verläuft bei Patient J01 sehr parallel mit der Konzentration des LDH Enzyms.

Im Konzentrationsverlauf der LDH lässt sich erkennen, dass nach Beginn der Kortisondauertherapie die LDH Konzentration kontinuierlich abnimmt und erst wieder bei der Infektion mit Influenza B ansteigt. Ansonsten ist der Verlauf stark an die O₂ Konzentration gebunden.

Der Verlauf der Proteinkonzentration variiert stark zwischen den einzelnen Lavagen, aber wenig zwischen den beiden Lungenseiten. Es ist kein einheitlicher Trend zu erkennen.

Die ausgespülten Phospholipidmengen variieren kaum zwischen den beiden Lungenseiten und es ist zu erkennen, dass die Phospholipidmengen in den Lavagen ab dem Beginn der Kortisondauertherapie stark abgenommen haben.

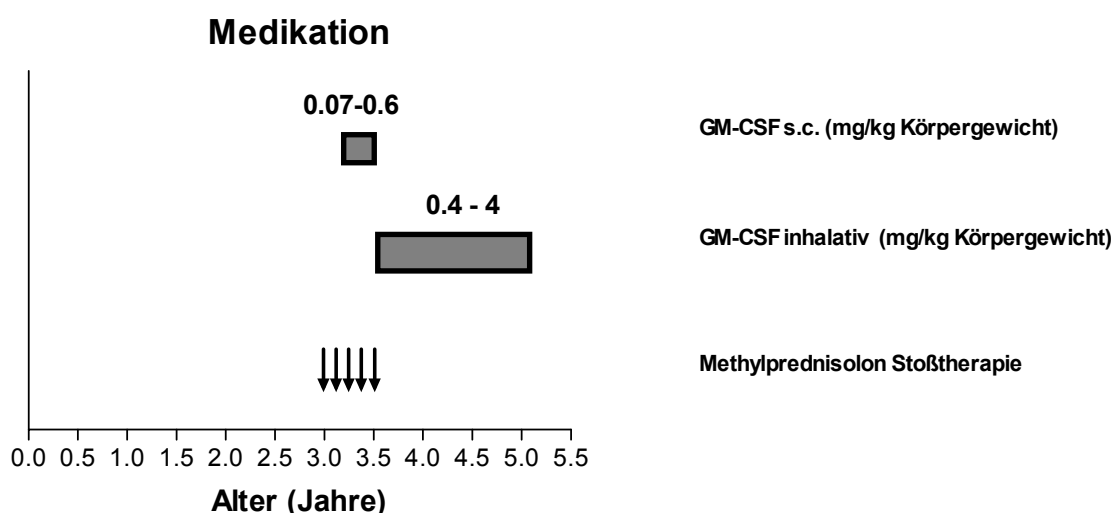
SP-A zeigt einen unterschiedlichen Verlauf der beiden Lungenseiten, aber eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration in den Lavagen nach Beginn der Kortisontherapie.

Der Verlauf von SP-D zeigt auf der rechten Lungenseite ebenfalls einen Abfall ab Kortisongabe, allerdings steigt die SP-D Menge der rechten Lungenseite daraufhin stark an.

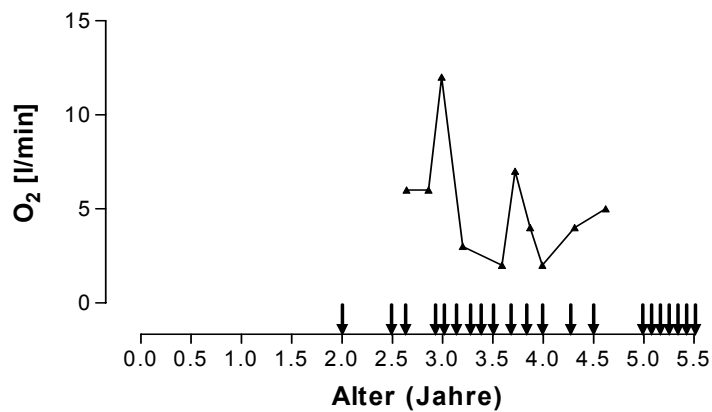
III.F.2. Patient J02

III.F.2.1. Variabilität der Surfactantbestandteile über die Zeit

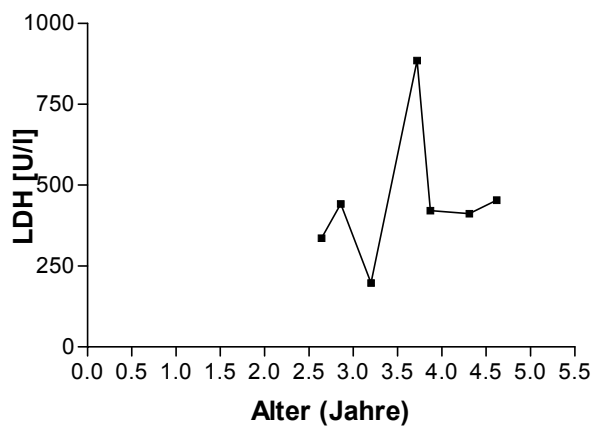
Der Patient J02 wurde am gleichen Tag wie Patient J01 geboren und ebenfalls über eine Dauer von 5 Jahren in unserer Klinik behandelt. Über diese Zeit wurden mehrere Lavagen durchgeführt. Im Folgenden sollen die verschiedenen gemessenen Lavagebestandteile mit der Medikation und einigen klinischen Parametern in Zusammenhang gebracht werden.



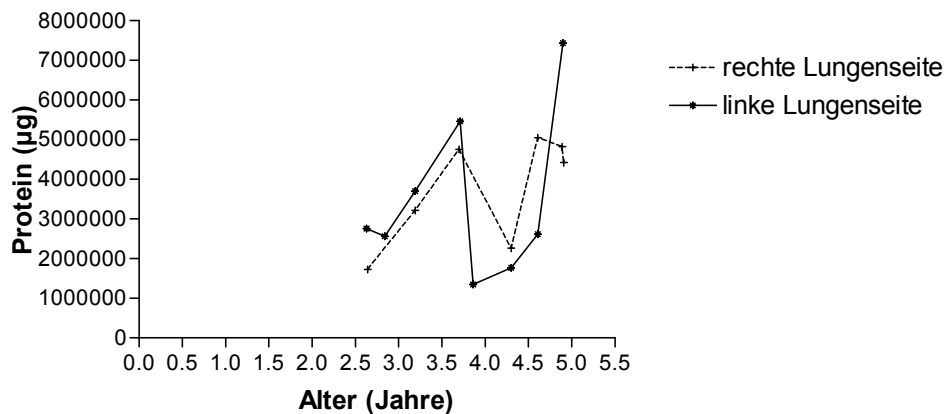
III.F.1.3.1.: Medikation des Patienten J02 ab dem 3. Lebensjahr.

O₂ - Bedarf

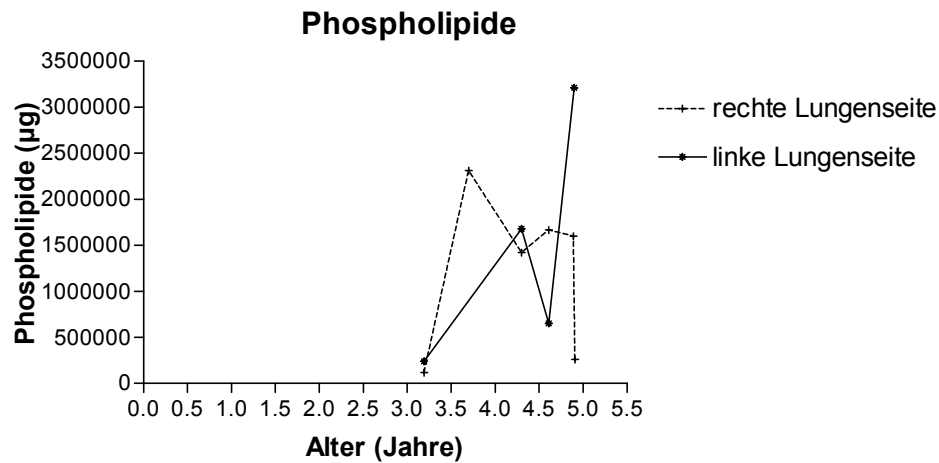
III.F.2.1.2.: Sauerstoffbedarf des Patienten J02 über 5,5 Jahre. Jeder Pfeil entspricht einer durchgeführten Ganzlungenlavage.

LDH

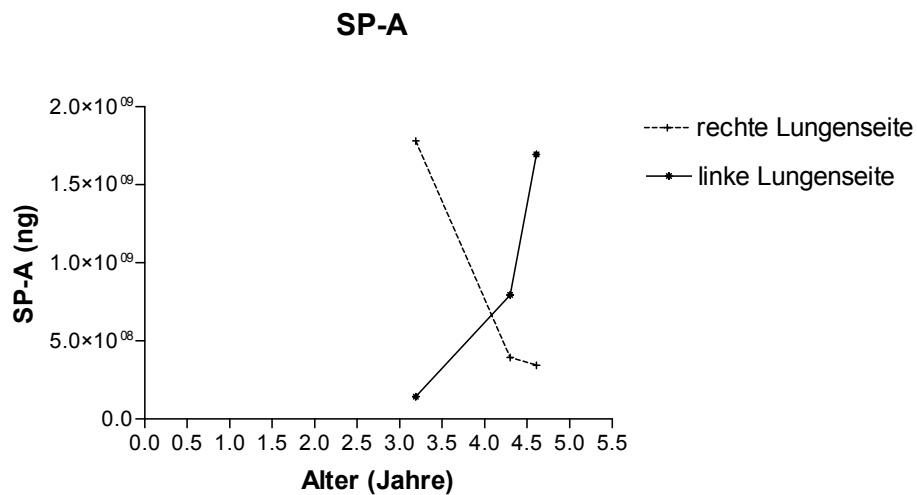
III.F.2.1.3.: LDH Konzentration im Serum des Patienten J01 über 5,5 Jahre. Eingezeichnet ist eine Infektion mit Influenza B.

Protein

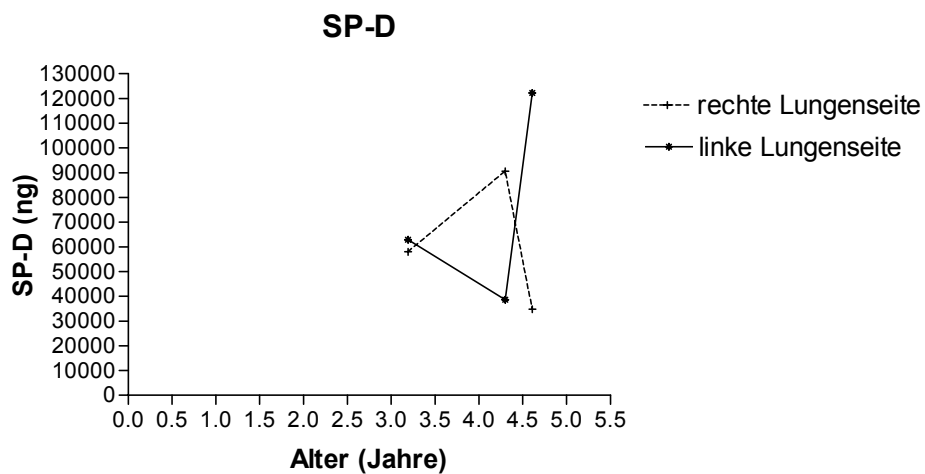
III.F.2.1.4.: Gesamtproteinmenge in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J02 über 5,5 Jahre in µg.



III.F.2.1.5.: Gesamtphospholipidmenge in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J02 über 5,5 Jahre in µg.



III.F.2.1.6.: Gesamtmenge an SP-A in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J02 über 5,5 Jahre in ng.



III.F.2.1.7.: Gesamtmenge an SP-D in den einzelnen Halblungenlavagen des Patienten J02 über 5,5 Jahre in ng.

Der O₂ Verbrauch verläuft bei Patient J01 sehr parallel mit der Konzentration des LDH Enzyms. Ist die LDH Konzentration erhöht, zeigt sich auch ein erhöhter Sauerstoffbedarf. Als sich bei Patient J02 initial eine Verschlechterung abzeichnete, wurde mit einer Kortisonstoßtherapie und der Gabe von GM-CSF s.c. begonnen. Der Sauerstoffbedarf ließ sich durch diese Maßnahme senken. Nach Beendigung der Stoßtherapie kam es zu einem erneuten Anstieg des Sauerstoffbedarfs, welcher sich aber dann durch Umstellung der s.c. Gabe von GM-CSF auf inhalative Gabe wieder senken ließ.

Der Konzentrationsverlauf des LDH ist stark an die O₂ Konzentration gebunden und ebenso empfindlich auf die Medikamententherapie.

Der Verlauf der Proteinkonzentration der beiden Lungenseiten ist nahezu identisch. Der kontinuierliche Anstieg der Proteinmenge zu Beginn der Erkrankung lässt sich durch die Kortisonstoßtherapie nicht durchbrechen. Erst nach Umstellung der GM-CSF Gabe von s.c. auf inhalative Darreichung kam es zu einem starken Abfall der Proteinmengen in den BALs. Diese Reduktion hielt aber nur ca. ein Jahr an und führte anschließend wieder zu Proteinwerten, welche vor der inhalativen GM-CSF Gabe vorlagen.

Die ausgespülten Phospholipidmengen variieren kaum zwischen den beiden Lungenseiten und verlaufen wie die Gesamtproteinmenge. Auch die ausgespülte Phospholipidmenge konnte durch die Kortisonstoßtherapie nicht gesenkt werden. Der Verläufe von SP-A und SP-D zeigen einen gegensätzlichen Verlauf der beiden Lungenseiten.

III.G. Erarbeitung einer Bestimmungsmethode für SP-B mittels HPLC

III.G.1. Extraktionsmethode

III.G.1.1. Native Auftragung

Für die Quantifizierung der Surfactantproteine mit Hilfe der HPLC ist es von entscheidender Bedeutung, die Zielproteine quantitativ auf die HPLC zu bringen und die Selektivität anhand der Reinheit der Peaks zu überprüfen. Zuerst wurde untersucht, ob eine Extraktion überhaupt notwendig ist, oder eine BAL direkt auf das System aufgetragen werden kann. Hierzu wurde die BAL des Patienten J 01 mit Hilfe von Centricons entsalzt (s. II.G.) und mit der mobilen Phase im Verhältnis 1:1 versetzt. Es ergab sich folgendes Chromatogramm:

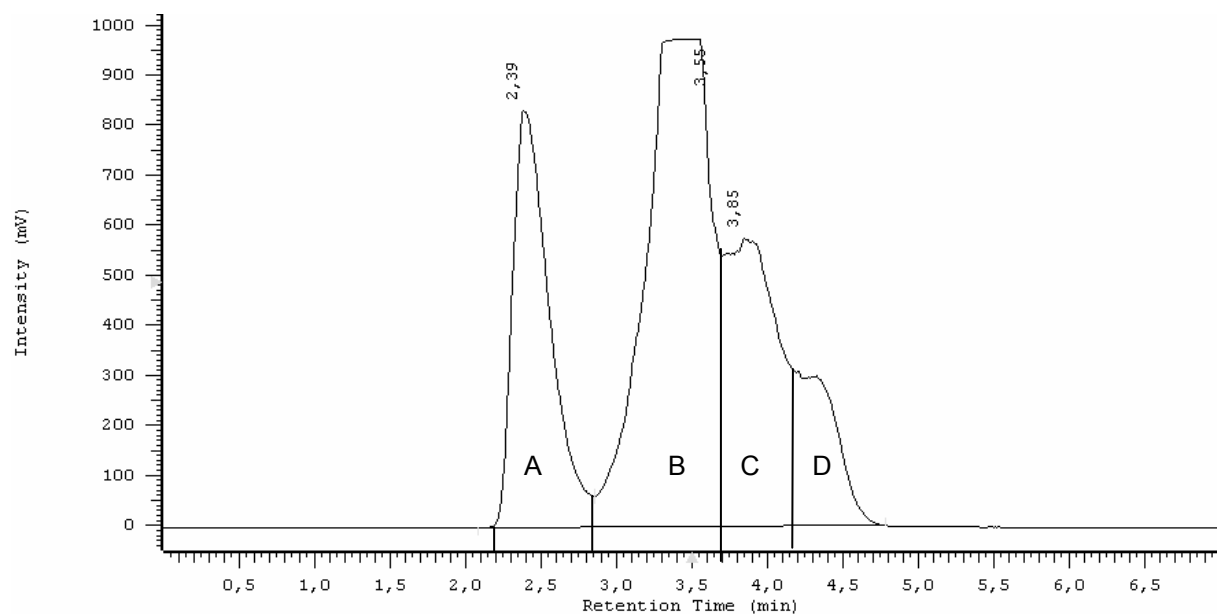


Abbildung III.G.1.1.1.: HPLC, ELSD Chromatogramm der nativen Lavage des Patienten A 01. Die gesammelten Fraktionen sind mit A-D bezeichnet.

Um die Reinheit der einzelnen Peaks beurteilen zu können, wurden die Fraktionen A bis D gesammelt, mittels 1D Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend silbergefärbt.

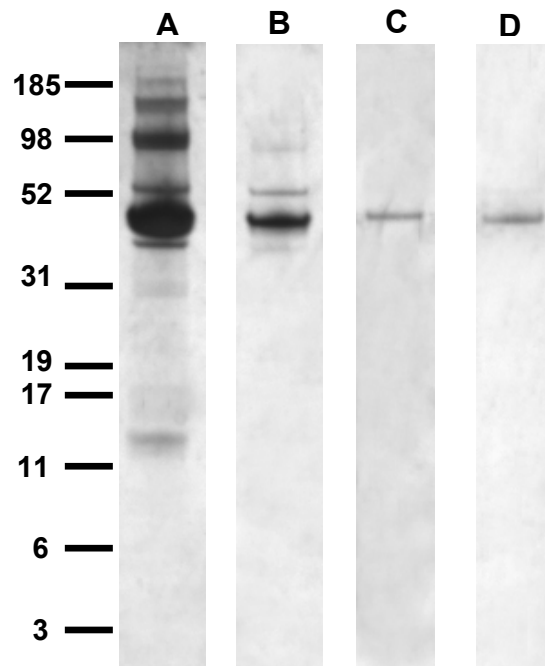


Abbildung III.G.1.1.2.: MES PAGE der einzelnen Fraktionen aus Abbildung C.1.1.2. Das erhaltene Gel wurde anschließend mit der Methode nach Heukershoven/Dernick silbergefärbt. Es wurde der Marker MultiMark 12 verwendet.

Es lässt sich deutlich erkennen, dass sich bei der HPLC Trennung der nativen BAL keine selektive Abtrennung des SP-B von den Serumalbuminen erreichen lässt. In Fraktion A sind sowohl der größte Teil der Serumproteine, als auch Sp-B (ca. 16 kDa) enthalten. Die Anreicherung von SP-B erfolgte zwar in Fraktion A, aber es konnte keine ausreichende Reinheit des Peaks erreicht werden.

Für eine effiziente Trennung der hydrophilen Serumalbumine von den hydrophoben Surfactantproteinen B, C und den Phospholipiden wurden verschiedene Verfahren der organischen Extraktion durchgeführt und validiert.

III.G.1.2. Methode nach Bligh Dyer

Als Standardverfahren der organischen Extraktion von Phospholipiden und lipophilen Surfactantproteinen wurde zunächst die Methode nach Bligh/Dyer/Folch^{5,20} durchgeführt. Die Überprüfung der Trennung der Extraktion erfolgte durch das Auftragen der Oberphase (hydrophile Phase mit Serumalbumin) und der Unterphase (Phospholipide und hydrophobe Surfactantproteine). Durch Immunodetektion konnte das Verbleiben von SP-B festgestellt werden.

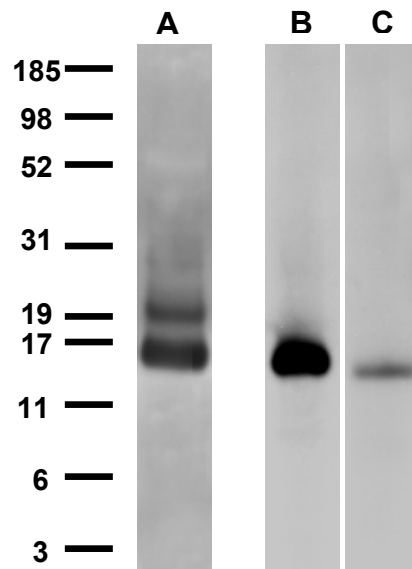


Abbildung III.G.1.2.1.: MES PAGE und anschließendes Immunoblotting mit Antikörper gegen SP-B der nativen BAL des Patienten A01(A) der Ober- (B) und Unterphase (B) der Extraktion nach der Methode nach Bligh/Dyer/Folch.

Nach Auswertung der Immunoblots kann man erkennen, dass sich SP-B in der hydrophilen Oberphase angereichert hat und nicht in der lipophilen Unterphase, wie eigentlich erwartet. Da sich in der hydrophilen Oberphase aber auch immer noch die störenden hydrophilen Serumproteine befinden, kann dieses Extraktionsverfahren nicht für die der HPLC vorgeschalteten Abtrennung der Serumproteine dienen.

III.G.1.3. Neue Extraktionsmethode

Ausgehend von einer Extraktionsmethode nach Beers et al.², wurde folgende Methode verwendet: Die native BAL wurde mit einer Lösung aus Chloroform : Methanol : Salzsäure (3:2:0,005N) im Verhältnis 1 zu 2 versetzt, 10 Minuten lang gevortext und dann 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Die Unterphase wurde abpipettiert, das Verfahren wiederholt und mit der anderen Unterphase vereinigt. Zur Überprüfung der Methode wurden erneut die Ober- und Unterphase untersucht.

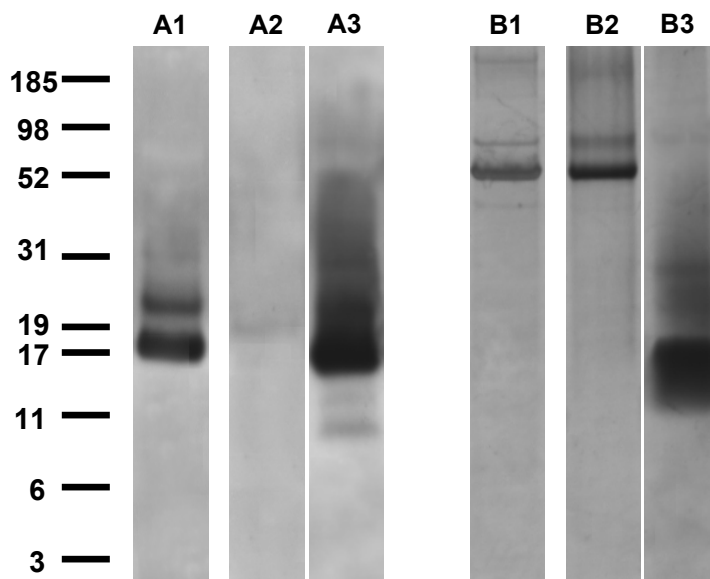


Abbildung III.G.1.2.1.: MES PAGE und anschließendes Immunoblotting mit Antikörper gegen SP-B der nativen BAL des Patienten A01(A1) der Ober- (A2) und der Unterphase (A3) der Extraktion nach der neuen Extraktionsmethode. Silberfärbung der nativen BAL des Patienten A01 (B1) der Ober- (B2) und der Unterphase (B3) der Extraktion der neuen Extraktionsmethode.

Durch diese neue Extraktionsmethode wurde nun eine quantitative Anreicherung von SP-B in der hydrophoben Unterphase erreicht. Störende Serumalbumine konnten erfolgreich abgetrennt werden. Diese hydrophilen Bestandteile finden sich ausschließlich in der wässrigen Oberphase und können somit nicht mehr zu falschen Ergebnissen der HPLC Quantifizierung von SP-B führen. Für die weitere HPLC Quantifizierung wurden die Unterphasen abpipettiert und unter Stickstoffbegasung eingedampft und anschließend in geeignetem Volumen der mobilen Phase resuspendiert.

III.G.2. Optimierung der Trennung

III.G.2.1. Fließmittel

Als Ausgangspunkt für die Trennung wurden zunächst sämtliche Parameter der in der Literatur beschriebenen HPLC Trennungsmethode nach Bünger et al.^{8;9} angewandt. Die wichtigsten Bestandteile sind eine Vydac C4 Säule, Chloroform :

Methanol : Trifluoressigsäure (47,5%:47,5%:5,0%) als mobile Phase und eine Säulentemperatur von 25°C. Das Trennergebnis mit diesen vorgegebenen Parametern ergab jedoch kein zufriedenstellendes Ergebnis (s. Abb. III.G.2.1.1.).

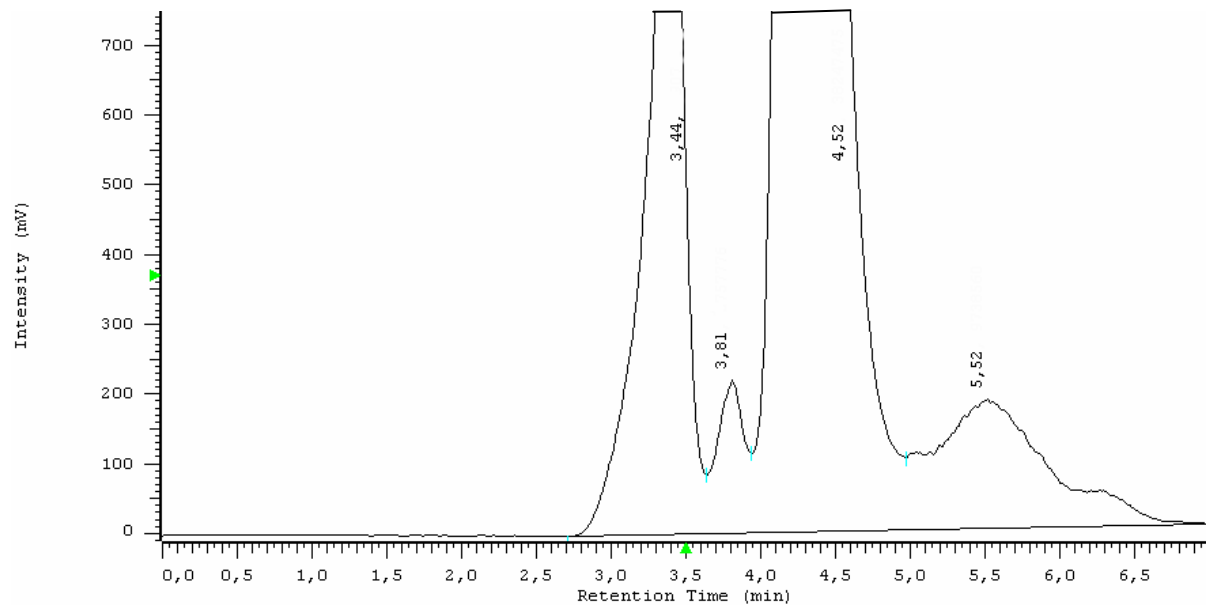


Abbildung III.G.2.1.1.: HPLC, ELSD Chromatogramm der BAL Extraktion des Patienten J03. Einstellungen: Mobile Phase: Chloroform:Methanol:Trifluoressigsäure (47,5%:47,5%:5,0%), Säulentemperatur 25°C.

Die einflussreichsten Parameter auf die Trennleistung sind die Temperatur der Säule und die Zusammensetzung des Lösungsmittels. Zunächst wurde die Zusammensetzung des Lösungsmittels insoweit verändert, als dass ein immer höherer Anteil an Methanol zugesetzt wurde, um die stark lipophilen Bestandteile der BAL, die Phospholipide, erst später von der Säule zu eluieren. Methanol hat für lipophile Substanzen eine geringere Elutionskraft als Chloroform. Die hydrophileren Substanzen, wie SP-B, sollten durch diese Veränderung schneller eluiert werden. Wie Abbildung III.G.2.1.2. zeigt, konnte durch eine Erhöhung des Methanolanteils in der mobilen Phase eine Peaktrennung erreicht werden.

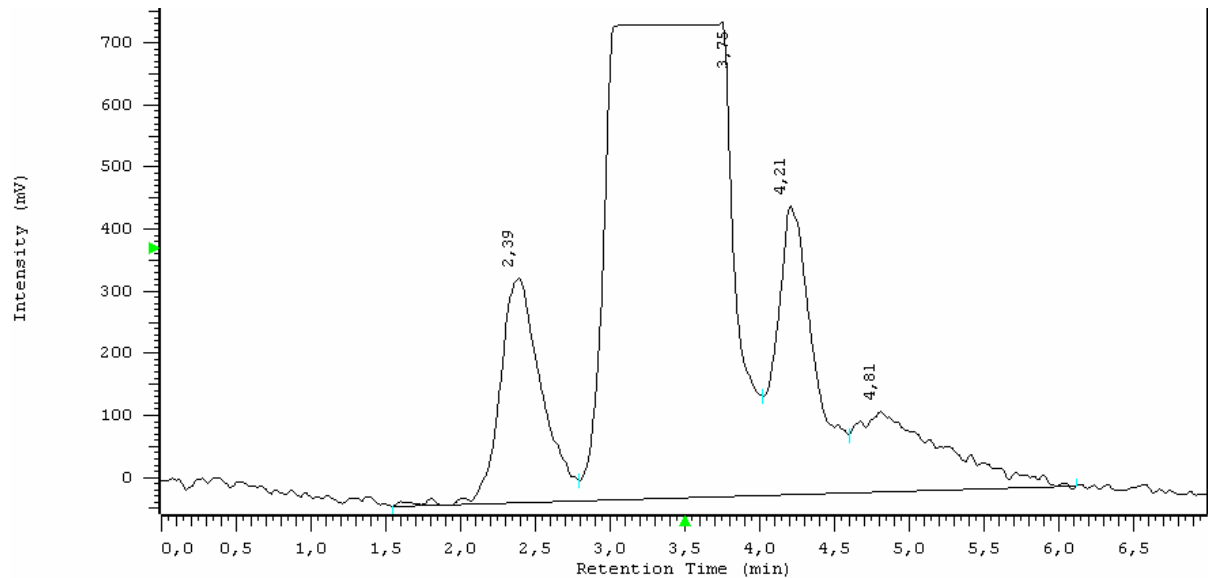


Abbildung III.G.2.1.2.: HPLC, ELSD Chromatogramm der BAL Extraktion des Patienten J03. Einstellungen: Mobile Phase: Chloroform:Methanol:0,1 M Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%), Säulentemperatur 25°C.

III.G.2.2. Säulentemperatur

Es stellte sich heraus, dass bei einigen analysierten Proben die Trennleistung immer noch nicht ganz optimal war, wie das Beispiel der Abbildung III.G.2.2.1. zeigt.

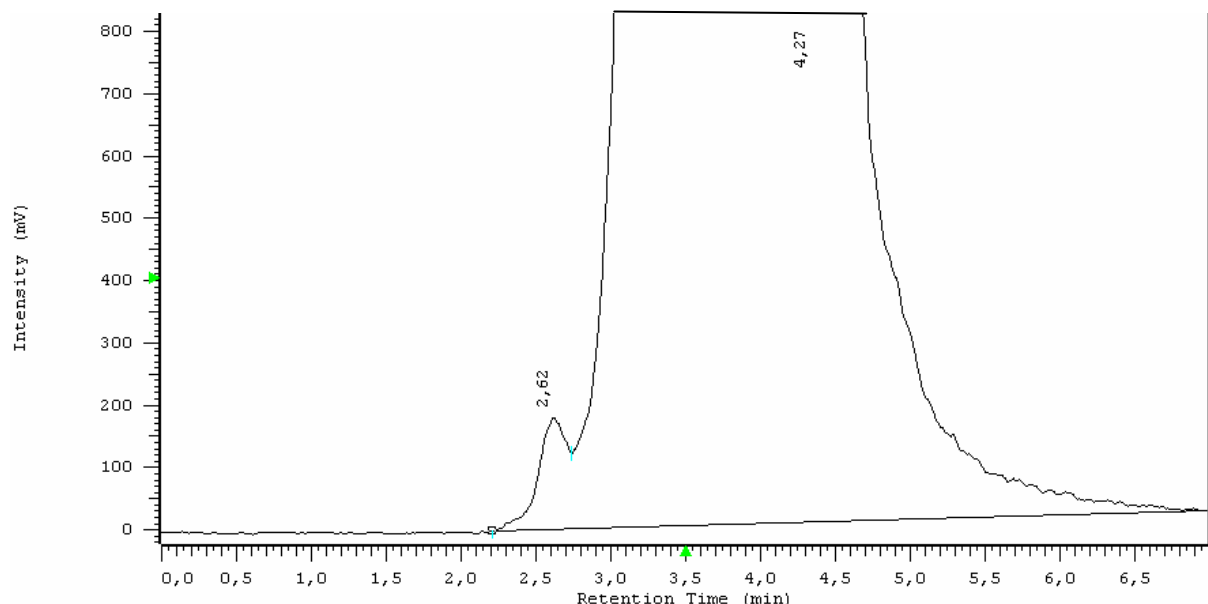


Abbildung III.G.2.2.1.: HPLC, ELSD Chromatogramm der BAL Extraktion des Patienten A01. Einstellungen: Mobile Phase: Chloroform:Methanol:0,1 M Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%), Säulentemperatur 25°C.

Um eine weitere Optimierung der Trennung zu erzielen, wurde die Temperatur der Säule schrittweise erniedrigt. Eine Erniedrigung der Säulentemperatur führt dazu, dass die Bindung der lipophilen Bestandteile, also der Phospholipide, an die Säule erhöht wird und somit eine noch stärkere Trennung der Peaks erreicht wird. Wie in Abbildung III.G.2.2.2. zu sehen ist, kann tatsächlich durch eine Temperaturerniedrigung der Säule eine bessere Trennleistung dieser Methode erreicht werden.

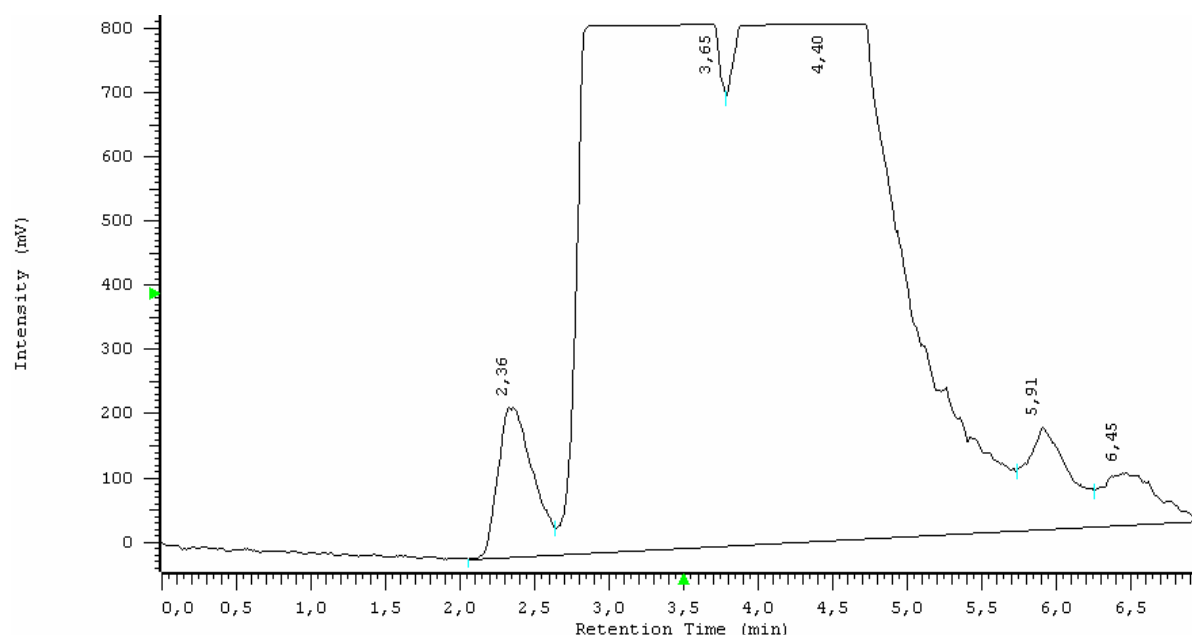


Abbildung III.G.2.2.2.: HPLC, ELSD Chromatogramm der BAL Extraktion des Patienten A01. Einstellungen: Mobile Phase: Chloroform:Methanol:0,1 M Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%), Säulentemperatur 5°C.

Sämtliche weitere Messungen zur Quantifizierung von SP-B wurden unter folgenden HPLC Bedingungen durchgeführt: Als mobile Phase wurde Chloroform:Methanol: 0,1 M Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%) verwendet und die Temperatur der Säule wurde bei 5°C gehalten.

III.G.3. Überprüfung der Trennung

Um die spezifische Abtrennung des SP-B von den anderen lipophilen Bestandteilen zu überprüfen, wurden die gesammelten Fraktionen sämtlicher Peaks mittels Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblotting und Inkubation mit SP-B Antikörper dargestellt (s. Abb. III.G.3.1.).

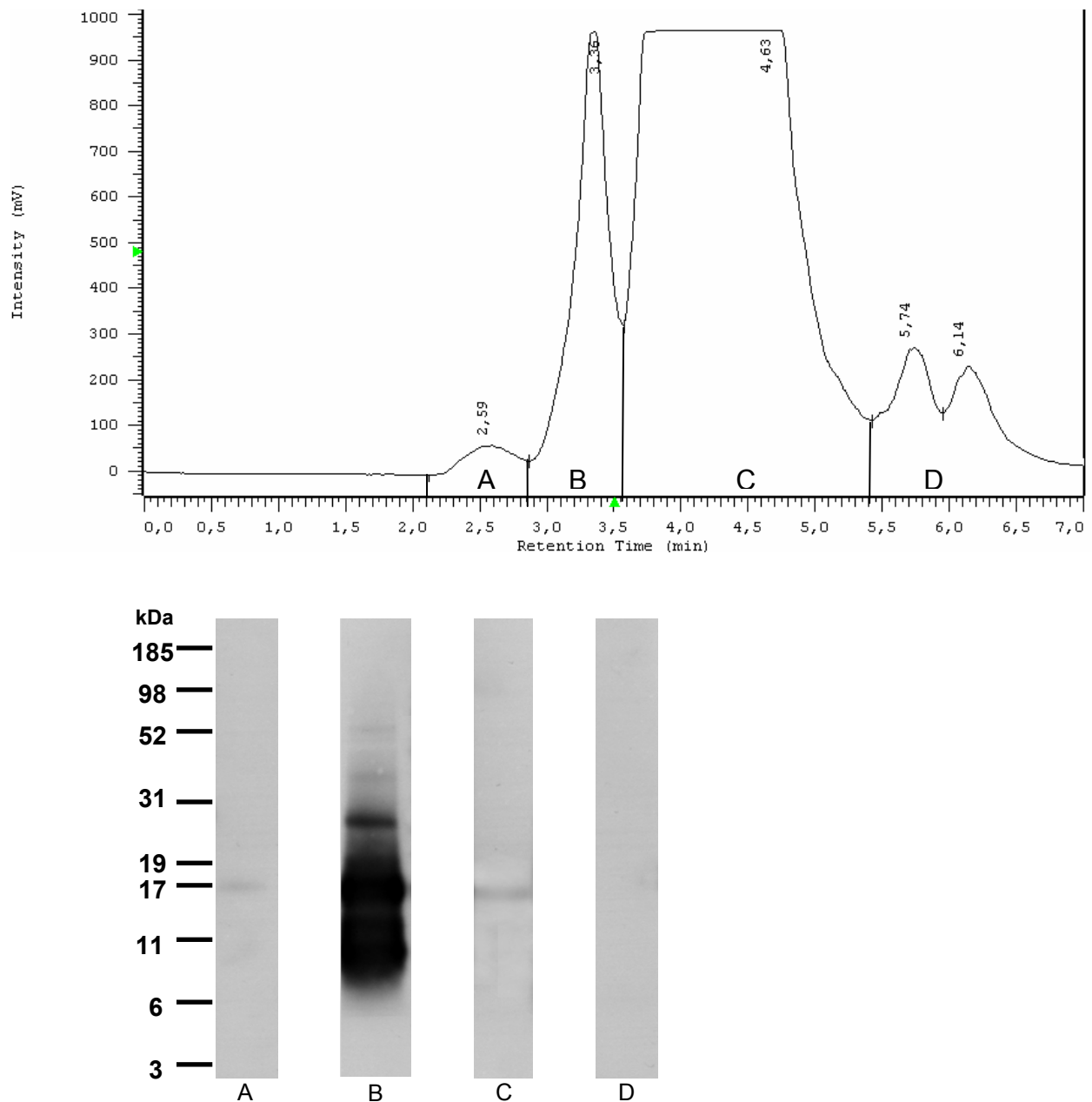


Abbildung III.G.3.1.: HPLC, ELSD Chromatogramm der BAL Extraktion des Patienten J01. Einstellungen: Mobile Phase: Chloroform:Methanol:0,1 M Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%), Säulentemperatur 5°C. Die Fraktionen A-D wurden mittels Gelelektrophorese getrennt: MES PAGE und anschließendes Immunoblotting mit Antikörper gegen SP-B .

Da bereits mittels Comassie und Silberfärbung bei der Erarbeitung der Extraktionsmethode gezeigt werden konnte, dass keinerlei störende Albuminbestandteile mehr in der Unterphase, welche auf die HPLC gebracht worden ist, vorhanden sind, kann davon ausgegangen werden, dass der Peak frei von störenden Albuminbestandteilen ist und deshalb nur SP-B enthält.

Durch die vorliegende Methode lässt sich SP-B quantitativ und selektiv von anderen Lavagebestandteilen abtrennen und quantifizieren.

III.G.4. Eichgerade

Für die Erstellung der Eichgerade wurde gereinigtes, humanes SP-B als externer Standard verwendet (Geschenk von Dr. Schmidt, Giessen). Die Konzentrationsbestimmung des SP-B erfolgte nach der Methode von Bradford⁶ und das Ergebnis wurde zusätzlich mittels quantitativer Aminosäureanalytik bestätigt. Es wurden 6 Messpunkte zwischen 865,79 ng und 27,06 ng ermittelt. Die entsprechenden „areas under the curves“ wurden errechnet und als Funktion der Konzentration dargestellt. Es ergab sich eine hyperbole Eichkurve, deren Funktion sich mittels der Gleichung $I = k \cdot m^b$ ermitteln ließ. Es wurde der Wert 1,197 für den Exponenten b und der Wert 3605 für die Konstante k berechnet (s.Abb. III.G.4.1.)

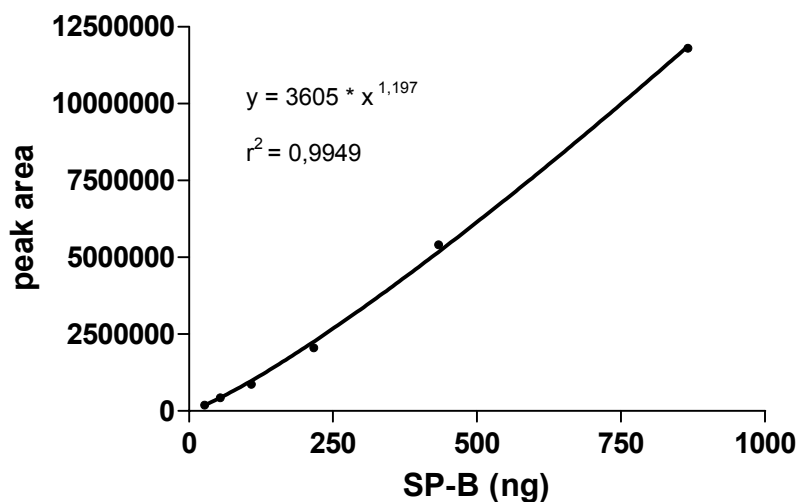


Abbildung III.G.4.1.: Eichgerade für die Quantifizierung von SP-B. Auf der x-Achse wurde die Menge an SP-B und auf der y-Achse die AUC des, durch SP-B erzeugten Peaks aufgetragen. Beide Achsen sind im linearen Maßstab.

Der Pearson Test, als Zeichen für die Korrelation der Funktion, ergab einen Wert von $r^2=0,9949$. Wird die Eichkurve im doppelt logarithmischen Maßstab dargestellt, ergibt sich eine Gerade mit der gleichen Funktion.

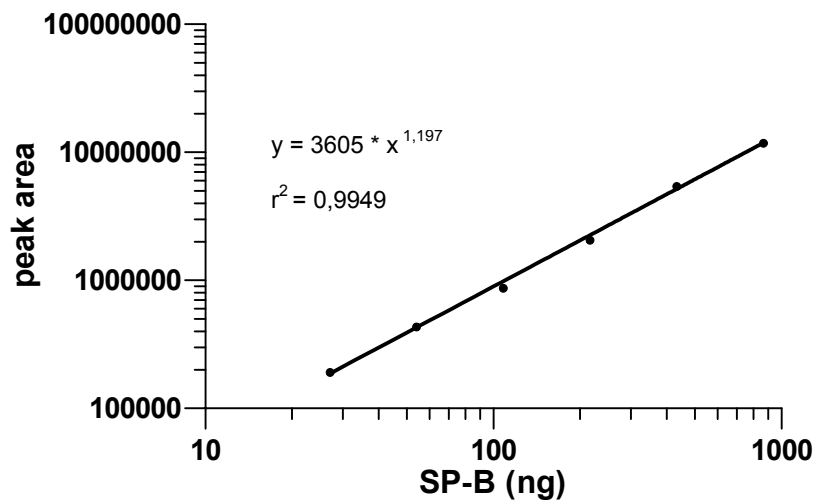


Abbildung III.G.4.2.: Eichgerade für die Quantifizierung von SP-B. Auf der x-Achse wurde die Menge an SP-B und auf der y-Achse die AUC des, durch SP-B erzeugten Peaks aufgetragen. Beide Achsen sind im logarithmischen Maßstab.

Um die durch HPLC ermittelten SP-B Konzentrationen zu verifizieren, wurden von 5 Patienten mit unterschiedlichen SP-B Konzentrationen Immunoblots angefertigt und semiquantitativ ausgewertet. Diese Auswertung erfolgte mittels der Software Quantity One® als Produkt der Fläche und Dichte (counts) der erhaltenen Spots (s. Abb. III.G.4.3.).

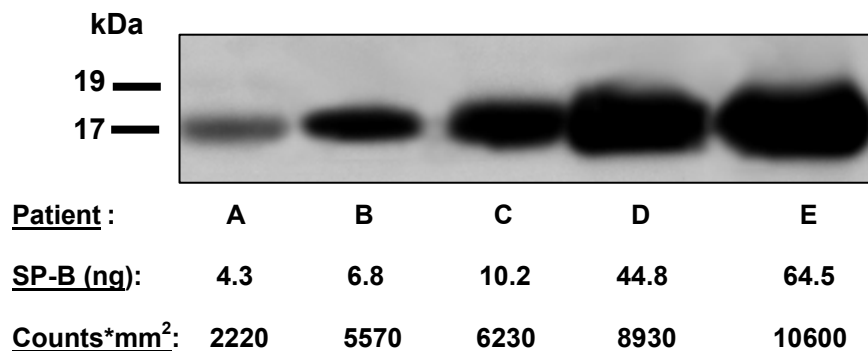


Abbildung III.G.4.3.: Immunoblot mit SP-B Antikörper von 5 Bronchitispatienten mit korrespondierenden SP-B Mengen, die aufgetragen wurden und dem Produkt aus counts und Fläche.

Die erhaltenen Ergebnisse wurden gegen die SP-B Menge aufgetragen (Abb. III.G.4.4.).

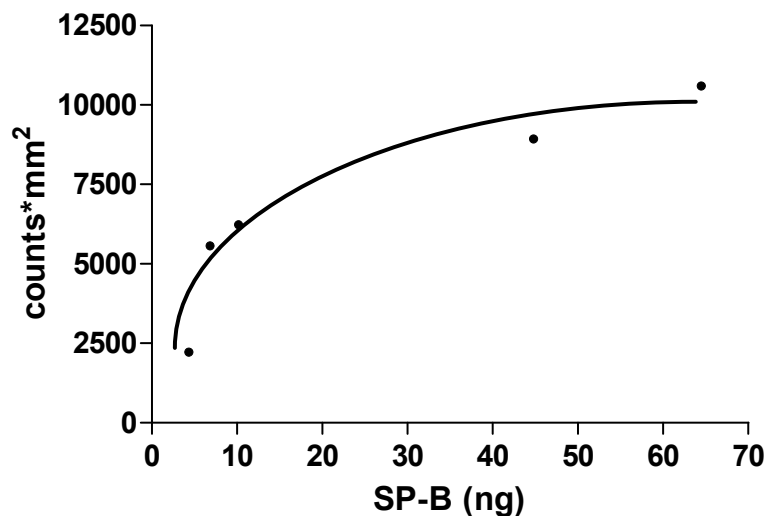


Abbildung III.G.4.4.: Korrelation der SP-B Menge auf Gel berechnet mittels HPLC und dem Produkt aus Dichte und Fläche der Spots nach Inkubation mit SP-B Antikörper.

Es ergab sich eine hyperbole Funktion, welche erkennen lässt, dass eine semiquantitative Auswertung des SP-B Gehaltes über Immunoblot in höheren Konzentrationsbereichen nicht möglich ist, da dort eine höhere SP-B Menge aufgrund der Sättigungseigenschaften des Immunoblots nicht mehr erkannt werden kann.

III.G.5. Validierung

III.G.5.1. Präzision

Die Präzision innerhalb eines Tages wurde bestimmt, indem 3 verschiedene Proben von 3 verschiedenen Patienten jeweils 9 mal wiederholt auf die HPLC gegeben wurden und für die ermittelten Werte an „area under the curve“ und die daraus ermittelte Menge an SP-B eine relative Standardabweichung berechnet wurde. Für die AUC ergab sich ein Wert von 2,4% und für die SP-B Quantifizierung ein Wert von 1,9%.

Für die Präzision an unterschiedlichen Tagen - es wurden 8 verschiedene Proben an 4 aufeinanderfolgenden Tagen vermessen - ergab sich für die relative Standardabweichung der Wert von 1,9% für die AUC und 1,6% für die berechnete Menge an SP-B.

Die mittlere Retentionszeit von SP-B lag bei 2,34 Minuten. Innerhalb eines Tages war die relative Standardabweichung von diesem Wert 1,4% und 1,8% für aufeinanderfolgende Tage.

III.G.5.2. Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze bezeichnet diejenige Menge an SP-B, welche gerade noch quantitativ bestimmt werden kann. Sie wird laut der Richtlinie der Internationalen Harmonisierungskonferenz¹ definiert als Signal zu Rausch Verhältnis von mindestens 10. Für die Bestimmung von SP-B mit der vorliegenden Methode wurde eine Bestimmungsgrenze von 30 ng festgelegt.

III.G.5.3. Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze ist diejenige Menge an SP-B, welche man gerade noch detektieren kann, d.h. seine Existenz mittels der HPLC nachweisen kann. Die Definition erfolgt laut der Richtlinie der Internationalen Harmonisierungskonferenz¹ als ein Signal zu Rausch Verhältnis von nicht weniger als 3. Bei der Durchführung der oben genannten Methode ergibt sich eine Nachweisgrenze für SP-B von 15 ng. Da das Respondersignal nicht direkt proportional zur Konzentration ist, können die Bestimmungsgrenze und die Nachweisgrenze nicht in ein gegenseitiges Verhältnis gesetzt werden.

IV. Diskussion

IV.A. Therapeutische Halblungenlavagen

IV.A.1. Gesamtgehaltsanalyse

Erst vor 50 Jahren wurde der erste Fall einer neuen Erkrankung mit dem Namen „Pulmonale Alveolarproteinose“ (PAP) beschrieben und festgestellt, dass es sich dabei um eine unphysiologische Ansammlung von PAS positivem Material im Alveolarraum handelt, welches einen hohen Lipid- und Proteinanteil aufweist⁶³. Dieses, aufgrund von Überproduktion oder ungenügender Wiederaufnahme in der Lunge abgelagerte Material⁴⁵, war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

IV.A.1.1. Protein

Alle bisherigen Untersuchungen zum Gesamtproteingehalt der BAL von PAP Patienten ließen lediglich die Aussage zu, dass sich erhöhte Proteingehalte in der Lunge von PAP Patienten befinden^{3;57;60;64}. Dies lag vor allem an der nicht standardisierten Lavagedurchführung und den nicht differenziert genug untersuchten Proben. Mit dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die Proteinkonzentrationen und Proteinmengen für 4 juvenile und 6 adulte PAP Patienten differenziert auf das Körpergewicht berechnet und nach diagnostischer und therapeutischer BAL getrennt analysiert. Die gefundenen BAL Proteinkonzentrationen waren gegenüber den Kontrollpatienten signifikant erhöht und lagen mit durchschnittlich 700 µg/ml Lavage im Bereich der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die 150 µg/ml⁶⁴, 1200 µg/ml⁵⁷ und 2000 µg/ml⁶⁵ gefunden hatten. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Proteinkonzentrationen bei den PAP Patienten gegenüber den Kontrollen zwar erhöht waren, es aber bezogen auf das Körpergewicht erstaunlicherweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den adulten Patienten und den Kontrollen gab. Absolut betrachtet zeigten die juvenilen und adulten PAP Patienten die gleiche Proteinkonzentration in der Lavage. Auf das Körpergewicht bezogen, waren die Konzentrationen der juvenilen Patienten signifikant erhöht. Insgesamt war die ausgespülte Menge an Protein bei den adulten Patienten höher als bei den juvenilen Patienten und bei beiden Patientengruppen höher als bei der Kontrollgruppe. Bezogen auf das Körpergewicht war jedoch die ausgespülte Proteinmenge zwischen den adulten und juvenilen Patienten nicht unterschiedlich. Bei keiner

Patientengruppe gab es Anzeichen für einen signifikanten Unterschied zwischen der rechten und linken Lungenseite.

IV.A.1.2. Phospholipide

Bisherige Untersuchungen des Gesamtphospholipidgehaltes der BALs von PAP Patienten sind rar. Onodera et al. fanden erhöhte Mengen an Phospholipid in der BAL von PAP Patienten, durchschnittlich 2 g^{57} , was einer um 15 fach erhöhten Konzentration entspricht. Wir konnten ebenfalls bestätigen, dass sich bei PAP Patienten starke Ablagerungen von kummuliertem Phospholipid finden. Eine andere Studie fand gegenüber Kontrollpatienten keine signifikant erhöhte Werte²⁷. In der vorliegenden Arbeit zeigten die 10 Patienten mit PAP im Vergleich zu den Kontrollpatienten keine signifikant unterschiedlichen Phospholipidkonzentrationen in der Lavage. Juvenile Patienten hatten nur auf das Körpergewicht bezogen gegenüber den adulten Patienten signifikant erhöhte Konzentrationen. Bei adulten PAP Patienten wurde insgesamt mehr Phospholipid aus der Lunge gespült als bei juvenilen Patienten. Bezogen auf das Körpergewicht gab es jedoch keine Unterschiede. Die Gesamtphospholipidmenge in den BALs war gegenüber den Kontrollpatienten ebenfalls erhöht. Betrachtet man allerdings nur die Poolfraktion, zeigten sowohl die adulten als auch die juvenilen Patienten auf das Körpergewicht bezogen keine Unterschiede zu den Kontrollpatienten. In keiner der Darstellungsweisen zeigten sich Unterschiede zwischen der rechten und linken Lungenseite.

IV.A.1.3. SP-A

Immunhistochemisch wurde von Brasch et al. eine abnorme intraalveoläre SP-A-Akkumulation unabhängig vom Lebensalter bei Erkrankungsbeginn und klinischem Verlauf nachgewiesen⁷, welche nicht quantifiziert wurde. Die einzigen quantitativen Untersuchungen des SP-A bei PAP wurden von Honda et al. und Doyle et al. durchgeführt. Honda et al. fanden einen erhöhten intraalveolären SP-A Gehalt in der BAL bei Patienten mit einer Alveolarproteinose, der gegenüber den Normwerten um das 10- bis 50- fache erhöht war³⁴. Doyle et al. zeigten eine Akkumulation um das 40- bis 100- fache. Anhand unserer Untersuchungen konnten wir diese Ergebnisse

bestätigen und fanden sowohl bei den Konzentrationen als auch für die ausgespülte Gesamtmenge bei den PAP Patienten gegenüber den Kontrollpatienten signifikant erhöhte Werte. Sowohl die ausgespülte Gesamtmenge, als auch die Konzentration der adulten Patienten war gegenüber den juvenilen Patienten signifikant erhöht, bezogen auf das Körpergewicht gab es jedoch keine Unterschiede. Des Weiteren stellten wir fest, dass sich für die rechte und linke Seite keine signifikant unterschiedlichen Werte ergaben.

IV.A.1.4. SP-D

In der BAL konnten Crouch et al. biochemisch bei Erwachsenen mit einer Alveolarproteinose eine Erhöhung des SP-D Gehaltes um das 10- bis 50- fache nachweisen¹². Honda et al. konnten dieses Ergebnis mit Werten bestätigen, welche 20-fach höher lagen als die SP-D Konzentrationen in der gesunden Kontrollgruppe und zeigten darüber hinaus, dass auch die Serumwerte des SP-D bei Patienten mit PAP signifikant erhöht sind³³. Eine weitergehende differenzierte Analyse des SP-D Gehaltes bei mehreren Patienten fehlte allerdings bis jetzt. Unsere Untersuchungen der SP-D Konzentration in BALs von PAP Patienten zeigte keine signifikante intraalveoläre Akkumulation im Vergleich zu den gesunden Patienten. Juvenile und adulte Patienten unterschieden sich nicht signifikant. Betrachtete man jedoch die Gesamtmenge an SP-D, so wurde bei den adulten PAP Patienten signifikant mehr an SP-D herausgespült, als im Vergleich zu den Kontrollen und juvenilen PAP Patienten. Juvenile Patienten zeigten ebenfalls mehr SP-D in der Lunge als Kontrollen. Die getrennte Darstellung des Pools und der Halblungenlavagen zeigte für den Pool, dass die adulten Patienten, bezogen auf das Körpergewicht, gleichviel SP-D in der BAL hatten im Vergleich zu den Kontrollen. Die Werte der juvenilen Patienten waren signifikant erhöht.

IV.A.2. Auswaschkinetik

Die bronchoalveoläre Lavage ist bei Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose die Therapie der Wahl^{38;66;68}. Trotz der häufigen Anwendung dieser Methode ist über die Veränderung der Bestandteile über den Verlauf der Lavage sehr wenig bekannt. Eine Arbeitsgruppe konnte eine kontinuierlich sinkende Kinetik von Phospholipiden und Proteinen bei einem Patienten mit Alveolarproteinose zeigen⁵⁷. Eine andere

Arbeitsgruppe fand eine ähnliche Auswaschkinetik bei einem Patienten mit PAP für die Surfactantproteine A und B und die Phospholipide¹⁵. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zur Auswaschkinetik von Gesamtprotein, Phospholipiden, SP-A und SP-D bei einem größeren Patientenkollektiv mit differenzierter Darstellung der Lungenseiten. Wir konnten zeigen, dass sich für juvenile und adulte PAP Patienten, mit Ausnahme eines juvenilen Patienten, für sämtliche Lavageparameter eine gleichmäßige hyperbole Auswaschkinetik ergibt, welche zwischen den Lungenseiten nicht unterschiedlich ist. Der Kontrollpatient mit Cholesterolpneumonitis zeigt ein ähnliches Auswaschverhalten wie die PAP Patienten.

Für SP-C konnte durch eindimensionale Gelelektrophorese mit anschließendem Immunoblot ebenfalls eine gleichmäßige Auswaschkinetik für die reduzierte und nicht reduzierte Form des Protein gefunden werden. Ein pädiatrischer PAP Patient mit einer Mutation im SP-C Gen zeigte drei verschiedene Proformen des SP-C, bei denen wir ebenfalls keine Unregelmäßigkeiten in der Auswaschfunktion erkennen konnten. Alle 3 spezifischen pro SP-C Banden zeigten sowohl in der reduzierten als auch in der nicht reduzierten Form ein gleichmäßiges Absinken der Konzentration.

Um Veränderungen im Proteinmuster der BAL während der Lavage erkennen zu können, wurden von den einzelnen Spülportionen der Patienten J01 und J02 2D Gele mit anschließender Silberfärbung angefertigt. Das Proteinmuster der BAL und des Serums der jeweiligen Patienten waren sich sehr ähnlich, nur zeigten sich im Serum hochmolekulare Proteine im Bereich von > 128 kDa. Über den Verlauf der Lavage verschwinden einige Proteinspots, aber das allgemeine Muster verändert sich nicht. Anhand der Gele lässt sich klar erkennen, dass während der fortlaufenden Lavage keine zusätzlichen Proteinspots über 60 kDa erscheinen, was den Schluß zulässt, dass eine therapeutische Halblungenlavage nicht zu einer weitergehenden Schädigung der Lungen und zu erhöhter Permeabilität für Serumproteine führt.

IV.B. Halblungenlavagen bei Perfluorcarboneinspülung

Partielle Flüssigkeitsventilation mit Perfluorcarbon ist eine Methode, welche bei Patienten mit schweren respiratorischen Erkrankungen eingesetzt wird, um die Lungenfunktion zu verbessern³⁰. Die weiteren Eigenschaften des PFC, wie hohe spezifische Dichte, geringe Oberflächenspannung und eine hohe Sauerstoffbindungskapazität¹⁴ haben dazu geführt, dass versucht wird, PFC dazu zu

verwenden, lösliche Zellbestandteile, übermäßig angesammeltes Protein und Phospholipid aus den Lungen auszuspülen^{49;73}. Zudem wurde festgestellt, dass PFC nicht nur Exsudat und Zelltrümmer effektiv entfernen kann, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Auswaschung von Entzündungsmediatoren spielt, welche eine sekundäre Lungenschädigung bewirken⁴⁰. Bei einem unserer Patienten mit anderweitig kaum zu behandelnder Lungenerkrankung wurde PFC im Sinne eines Heilversuches angewandt. Dazu wurde während der salinen BAL die Lunge einmal mit 100 ml Perflubron gespült. Der Vorteil von PFC ist, dass sich durch seine hohe spezifische Dichte tiefe kollabierte Lungensegmente besser erreichen lassen, übermäßiges Protein und Phospholipid aufschwimmt und sich somit leichter ausspülen lässt. Wir konnten zeigen, dass bei einer von den 3 durchgeführten Lavagen die PFC Einspülung zu einer erhöhten Proteinkonzentration bzw. -menge in den auf die Einspülung folgenden Lavagen führte, es aber bei den anderen zwei BALs keine Veränderungen gab. Die Phospholipidkonzentration bzw. -menge war einmal erniedrigt, einmal gleich und einmal erhöht. Es wurde also nur ein vergleichsweise geringer Effekt erzielt, so dass weitergehende Untersuchungen notwendig sind, um über die Bedeutung der Technik endgültig zu entscheiden.

IV.C. Biophysikalische Funktionen

In der Literatur sind bislang nur 4 Ergebnisse von Messungen der Oberflächenspannung zu finden. Drei davon deuten daraufhin, dass die Oberflächeneigenschaften von PAP Patienten geringfügig erniedrigt sind^{27;43;60}. Eine andere Veröffentlichung zeigte im Tierversuch stark erniedrigte Oberflächeneigenschaften²⁹. Sämtliche Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wurden mit dem Bubble Surfactometer gemessen. Unsere Ergebnisse wurden mit dem Capillary Surfactometer ermittelt. Wir konnten zeigen, dass die Oberflächeneigenschaften, ausgedrückt in %open, bei adulten PAP Patienten sehr stark erniedrigt und bei juvenilen PAP Patienten um im Mittel 50% reduziert waren. Die Kontrollpatienten hatten eine normale Surfactanteigenschaft von 100% open. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass sich die Surfactanteigenschaften in den einzelnen Spülportionen über den Verlauf der Lavage nicht ändern. Es konnte zusätzlich eine signifikante

Korrelation zwischen dem Initialdruck und der Öffnungszeit der Kapillare nachgewiesen werden.

IV.D. Erarbeitung einer Monitoringmethode für die Auswascheffizienz einer Lavage

Die bronchoalveoläre Lavage ist für die Erkrankung der pulmonalen Alveolarproteinose sowohl im Kindes- als auch im Erwachsenenalter die therapeutische Methode der Wahl¹¹. Die bronchoalveoläre Lavage wird solange durchgeführt, bis nach visueller Überprüfung der einzelnen Lavageportionen anhand der Trübung eine ausreichende Auswaschung von überschüssigem Protein und Phospholipid erreicht wurde. Diese Vorgehensweise erlaubt keine reproduzierbare Lavagedurchführung und keine objektive Beurteilung des Endpunktes der Lavage, an dem nur noch physiologische Mengen an Protein und Phospholipiden in der Lunge vorhanden sind. Aus diesem Grund sollte eine einfache photometrische Messung entwickelt werden, um den Verlauf der Auswascheffizienz simultan während der Lavage verfolgen zu können und den Endpunkt der Lavage bei physiologischen Protein- und Phospholipidkonzentrationen festzulegen.

Als optimale Messwellenlänge für das Monitoring wurden 405 nm gewählt. Diese Messwellenlänge ist der beste Kompromiss zwischen Empfindlichkeit und der Möglichkeit, über den gesamten Messbereich ein auswertbares Ergebnis zu erhalten. Mit einem p-Wert von $< 0,0001$ wurde bei den Patienten J01 und J02 sowohl zwischen der Proteinkonzentration und der gemessenen optischen Dichte als auch zwischen der SP-A Konzentration und der optischen Dichte eine signifikante Korrelation ermittelt. Die Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Phospholipid-, bzw. SP-D Konzentration war mit $< 0,05$ ebenfalls signifikant.

Für die Validierung der Methode wurden die Abweichungen zwischen, mittels Proteinassay direkt gemessenen und die über eine Eichgerade ermittelten Proteinkonzentrationen in Bland Altman Blots dargestellt. Es zeigte sich, dass die Werte über den gesamten Messbereich gleich blieben und nie mehr als 100% vom Durchschnitt abwichen. Anhand der Kontrollgruppe wurde eine physiologische Proteinkonzentration in der Lavage bei unter 100 µg/ml, bzw. einer Absorption von 0,038 festgelegt. Die Responder Operator Curve zeigt für diese Werte eine Fläche

von 0,9079, was eine aussagekräftige Unterscheidung zwischen noch zu viel in der Lunge vorhandenem Surfactantmaterial und dem Endpunkt der Lavage erlaubt.

Das Wissen um die direkte Proportionalität von Surfactantparametern und der Absorption ermöglicht eine weitgehende Standardisierung der Lavage. Durch diese bessere Kontrolle des Auswaschvorganges können Lavagen zu einem Zeitpunkt beendet werden, an dem eine weitere Spülung der Lunge keine große Effizienz mehr bedeutet. Daraus resultiert unter anderem auch eine Verkürzung der Narkosezeit.

IV.E Weitergehende biochemische Charakterisierung einzelner Patienten

Ein pädiatrischer Patient der untersuchten PAP Patienten wies eine heterozygote Missense Mutation im SP-C Gen auf^{53;54}. Aufgrund einer offenen Lungenbiopsie wurde bei ihm sowohl die Diagnose der pulmonalen Alveolarproteinose als auch eine intestitielle Lungenerkrankung festgestellt. Er zeigte ein alveoläres Füllungssyndrom mit amorphem Material, was zu schweren Gasaustauschstörungen führte. Ganzlungenlavagen und die Behandlung mit Steroiden und Azathioprin zeigten eine weitgehende Besserung des Gasaustausches. Die bei diesem Patienten erstmals beschriebene Missense Mutation beruhte auf einem Austausch von Isoleucin gegen Threonin im SP-C Gen (I73T)^{76;19}. Diese Mutation zeigt sowohl ein voll prozessiertes reifes SP-C, welches überwiegend (> 99,9%) in der monomeren Form vorliegt, als auch abnormal prozessiertes pro SP-C, was den Schluss zulässt, dass diese Mutation die Prozessierungsvorgänge des pro SP-C beeinflusst.

Für SP-A zeigt sich ein normales Bandenmuster. Es zeigte sich kein absoluter SP-B Mangel und das SP-B lag ohne abnorme Veränderungen in der dimeren und zu geringem Prozentsatz in der tetrameren Form vor. Pro SP-B konnte bei 19-21 kDa und 23-25 kDa nachgewiesen werden. Dies stellt aber keine Besonderheit dar, da bei fast allen Patienten pro SP-B nachgewiesen werden kann. SP-C war bei Patient J01 sowohl in der monomeren als auch in der dimeren Form vorhanden. Des Weiteren konnten wir Proformen des SP-C bei 12, 14 und 19 kDa mit dem Antikörper von M. Beers und eine Proform bei 14 kDa mit dem Antikörper von J. Whitsett nachweisen. Für SP-D zeigten sich reife monomere und dimere Formen.

Die Auftrennung der Proteine mittels 2D Gelelektrophorese und die anschließende Identifizierung einzelner Proteinspots durch Massenspektrometrie ergab das gleiche

Muster und Ergebnis wie in der Literatur beschrieben^{28;48;72;81;82}. Die weitere Detektion mit Immunoblot konnte die Surfactantproteine SP-A, pro SP-B und SP-D gut identifizieren. Die Detektion von SP-B, SP-C und pro SP-C war jedoch nicht spezifisch möglich, was wahrscheinlich an ihrer starken Hydrophobizität liegt.

Es konnte weiter gezeigt werden, dass die 3 spezifischen pro SP-C Banden von Patient J01 weder O- noch N-glycosiliert sind. Bei Patient J02 wurde durch eine Inkubation mit N-Deglycosidase eine weitere spezifische, knapp oberhalb der schon bestehenden pro SP-C Bande liegende neue Bande erzeugt. Bei beiden Patienten konnten die zwei identisch vorhandenen pro SP-B Banden bei 21, bzw. 25 kDa durch Inkubation mit N-Deglycosidase auf eine Größe von 16, bzw. 21 kDa reduziert werden.

IV.F. Variabilität der Surfactantproteine über die Zeit

Bei Patient J01, welcher unter pädiatrischer pulmonaler Alveolarproteinose leidet, wurde die Konzentration und das Muster von reifem SP-C und den aberranten pro SP-C Formen zu 7 verschiedenen Zeitpunkten überprüft, an denen jeweils eine Lungenlavage stattgefunden hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen über diesen Zeitraum von zweienhalb Jahren stark schwankten und es keinen Zusammenhang zwischen den Konzentration des SP-C und des pro SP-C gab.

Wir hatten die Möglichkeit, zwei Patienten (J01, J02) mit pädiatrischer PAP über den Zeitraum von 5 Jahren zu untersuchen. Patient J01 weist eine Mutation im SP-C Gen auf, wobei Patient J02 ebenfalls eine pädiatrische PAP ohne nachweisbaren genetischen Defekt zeigt. Dafür standen uns jeweils die repetitiven BAL's über diesen Zeitraum, sowie die Medikation und medizinische Parameter zur Verfügung.

Die Sauerstoffbedarfskurve des Patienten J01 zeigt über den Beobachtungszeitraum einen parallelen Verlauf zu den gemessenen LDH Werten im Serum, was darauf hindeutet, dass der Serum LDH Spiegel ein indirekter Indikator für die pathologische Surfactantanreicherung in der Lunge ist^{21;31;50}. Der Sauerstoffbedarf, ein direkter Indikator für den Zustand des Patienten, zeigte zu Beginn der Erkrankung einen kontinuierlichen Anstieg trotz repetitiver Lungenlavagen. Nach einer Kortisonstoßtherapie sank der Verbrauch für ein halbes Jahr signifikant ab. Danach

stieg der Sauerstoffbedarf aufgrund einer Infektion mit Influenza B stark an. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Behandlung mit Kortison eine Verbesserung der klinischen Symptome ermöglicht. Dies steht anscheinend im Gegensatz zu Berichten aus der Literatur⁷⁰. Allerdings beziehen sich diese Berichte auf die adulte Form der PAP ohne Beteiligung des Interstitiums, während bei unserem Patienten gleichzeitig eine signifikante interstitielle Entzündungsreaktion vorlag. Eine Infektion mit Influenza B führt zu einer Verschlechterung der Sauerstoffsättigung^{46;84}. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal für die Parameter Gesamtprotein, Phospholipid, SP-A und SP-D in der Lavage die Veränderung über einen längeren Zeitraum bestimmt werden. Es zeigte sich, dass die Gesamtproteinkonzentration in der Lunge stark zwischen den einzelnen Lavagezeitpunkten schwankt und durch eine Kortisongabe nicht signifikant beeinflusst wird. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Lungenseiten festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Kortisontherapie die Phospholipid- und SP-A Konzentration in der Lunge signifikant gesenkt werden. Für SP-D konnte ein Abfall der Konzentration nur für eine Lungenseite beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch Kortisongabe die klinischen Symptome einer PAP verbessert werden können, indem die Phospholipidkonzentration in der Lunge absinkt bei wenig veränderter Gesamtproteinkonzentration. Die genauen regulativen Mechanismen müssen zunächst unklar bleiben.

Bei Patient J02 konnte ebenso wie bei Patient J01 ein paralleler Verlauf des Sauerstoffbedarfs und der Serum LDH Konzentration beobachtet werden. Eine Kortisonstoßtherapie führte zu einer Verbesserung der klinischen Symptome mit einem Abfall des Sauerstoffbedarfs und einem Abfall der Gesamtproteinkonzentration in der Lavage. Bei Patient J02 konnten zwar keine Autoantikörper gegen GM-CSF festgestellt werden, eine Umstellung der Gabe von GM-CSF von einer subkutanen auf eine pulmonale Darreichung wirkte sich dennoch günstig auf den Sauerstoffbedarf aus und ließ die Phospholipidkonzentration sinken, was auch schon in der Literatur beschrieben wurde^{39;65;67;69}. Die Reduktion der Protein- und Phospholipidkonzentration hielt jedoch nur ein Jahr an. Im Anschluß stiegen die Werte wieder an. Die SP-A und SP-D Werte verhielten sich in den beiden Lungenseiten gegensätzlich.

Es zeigte sich, dass das Ansprechen einer medikamentösen Therapie bei Patienten mit Alveolarproteinose stark von den zu Grunde liegenden vielfältigen Ursachen abhängt.

IV.G. Erarbeitung einer Bestimmungsmethode für SP-B mittels HPLC

Quantifizierungsmethoden für SP-B in bronchoalveolärer Lavage, die in der Literatur zu finden sind, verwenden entweder die ELISA Methode⁴² oder führen eine Quantifizierung mittels HPLC^{8;9;26} oder FPLC⁷⁸ durch. Das Problem der Quantifizierung mittels ELISA sind zum einen die Löslichkeit im wässrigen Medium und Störungen durch die große Menge an Phospholipiden⁸⁰. Mehrere Waschschrte zur Entlipidierung lassen eine quantitative Bestimmung anzweifeln. Das Problem an der Bestimmung durch chromatographische Verfahren ist zum einen die geringe Sensitivität von 600 ng⁹, bzw. 1 µg⁷⁸ SP-B, welche die Bestimmung von normalen SP-B Werten nicht zulässt, die sehr langen Trennzeiten von 40 Minuten²⁶ und die Extraktionsmethode vor der chromatographischen Auftragung. Hierbei werden Dichtegradientenzentrifugation und mehrere organische Extraktionsschritte miteinander kombiniert. Eine quantitative Extraktion ist auch hier anzuzweifeln. Wir konnten feststellen, dass die bisher verwendeten organischen Extraktionsmethoden keine quantitative Anreicherung ergaben. Aus diesem Grund entwickelten wir eine neue, einfache, nur zwei Schritte beinhaltende Extraktionsmethode auf Basis einer Veröffentlichung von Beers et al.². Die Extraktion wurde mit einer Lösung aus Chloroform : Methanol : Salzsäure (3:2:0,005 N) durchgeführt. Die so erhaltene Unterphase wurde auf eine HPLC Anlage mit einer reversed phase Säule Vydac C4 aufgetragen und mit Hilfe einer mobilen Phase, bestehend aus Chloroform : Methanol : Trifluoressigsäure (97,0%:2,75%:0,25%) getrennt. Sämtliche HPLC Parameter wurden modifiziert, um eine optimale Trennung zu erreichen, und die erhaltenen Ergebnisse validiert. Durch Western Blot der verschiedenen Fraktionen der Extraktion konnte gezeigt werden, dass die vorliegende Extraktionsmethode eine selektive Bestimmung von SP-B zulässt.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtmengen und Konzentrationen der einzelnen Spülportionen an Protein, Phospholipid, SP-A und SP-D in den bronchoalveolären Lavagen von 4 juvenilen und 6 adulten Patienten mit pulmonaler Alveolarproteinose und einem Patienten mit Cholesterolpneumonitis bestimmt, und die Auswaschkinetik dieser Parameter über den Verlauf der Lavagen dargestellt. Auch wurde die Auswaschkinetik der Proformen des SP-C bei einem Patienten ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Perfluorcarboneinspülung nur einen vergleichsweise geringen Effekt auf die Auswascheffizienz einer Lavage zeigt, so dass weitergehende Untersuchungen notwendig sind, um über die Bedeutung der Technik endgültig zu entscheiden.

Wir konnten zeigen, dass die Oberflächeneigenschaften bei adulten PAP Patienten sehr stark erniedrigt und bei juvenilen PAP Patienten um im Mittel 50% reduziert waren im Vergleich zu den Kontrollpatienten. Die Surfactanteigenschaften in den einzelnen Spülportionen über den Verlauf der Lavage ändern sich nicht. Es konnte zusätzlich eine signifikante Korrelation zwischen dem Initialdruck und der Öffnungszeit der Kapillare nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine direkte Proportionalität von Surfactantparametern und der Absorption der Nativlavage gezeigt werden und aus dieser Erkenntnis heraus eine Methode entwickelt werden, mit deren Hilfe durch eine einfache photometrischen Messung die Auswascheffizienz simultan während der Durchführung der Lavage überwacht werden kann und somit Lavagen zu einem Zeitpunkt beendet werden können, an dem eine weitere Spülung der Lunge keine große Effizienz mehr bedeutet.

Das Proteinmuster von 2 pädiatrischen PAP Patienten wurde durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese dargestellt und einzelne Spots mit Massenspektrometrie charakterisiert. Das Glycosilierungsmuster des SP-B und SP-C dieser Patienten wurde durch enzymatische Deglycosilierung untersucht und festgestellt, dass die in beiden Patienten vorhandenen pro SP-B Banden N-glycosiliert sind.

Anhand klinischer Daten und den dazugehörigen ermittelten Surfactantparametern konnte der Effekt verschiedener therapeutischer Maßnahmen auf den Verlauf der Erkrankung bei 2 pädiatrischen PAP Patienten gezeigt werden.

Für die Bestimmung von SP-B in Bronchiallavagen wurde eine neue Extraktions- und HPLC Methode entwickelt und validiert, welche es zum ersten Mal erlaubt, aufgrund seiner Sensitivität auch Lavagen von gesunden Patienten zu quantifizieren.

VI. Anhang

VI. Literaturverzeichnis

1. Validation of procedures: Recommended for adoption at Step ICH process on 6 November 1996 by ICH Steering Committee. 6-11-1996. ICH Steering Committee. 6-11-1996.
2. Beers, M. F., S. R. Bates, and A. B. Fisher. 1992. Differential extraction for the rapid purification of bovine surfactant protein B. *Am J Physiol* 262:L773-L778.
3. Bell, D. Y. and G. E. Hook. 1979. Pulmonary alveolar proteinosis: analysis of airway and alveolar proteins. *Am Rev.Respir.Dis.* 119:979-990.
4. Berg, T., R. Leth-Larsen, U. Holmskov, and P. Hojrup. 2000. Structural characterisation of human proteinosis surfactant protein A. *Biochim.Biophys.Acta* 1543:159-173.
5. Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-917.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.,72 ed. 248-254.
7. Brasch, F., Birzele, J., Wiethage, T., Guttentag, S., and Beers, M. F. Klassifikation der Alveolarproteinosen im Neugeborenen-, Säuglings-, Kindes- und Erwachsenenalter.
8. Bünger, H., L. Kaufner, and U. Pison. 2002. Quantative analysis of hydrophobic pulmonary surfactant proteins by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J.Chromatogr.* 870:363-369.
9. Bünger, H., R.-P. Krüger, S. Pietschmann, N. Wüstneck, L. Kaufner, R. Tschiersch, and U. Pison. 2001. Two hydrophobic protein fractions of ovine pulmonary surfactant: isolation, characterization, and biophysical activity. *Protein Expr Puri* 23:319-327.
10. Chander, A. and A. B. Fisher. 1990. Regulation of surfactant secretion. *Am.J.Physiol.* 258:L241-L253.
11. Costabel, U. and J. Guzman 2000. Alveolar Proteinosis. In D. Olivieri and R. M. du Bois, editors Interstitial Lung Diseases Eur Respir Monograph, 194-205.
12. Crouch, E., A. Persson, and D. Chang. 1993. Accumulation of surfactant protein D in human pulmonary alveolar proteinosis. *Am.J.Pathol.* 142:241-248.
13. Crouch, E. 1998. Collectins and pulmonary host defense. *Am.J.Resp.Cell Mol.Biol.* 19:177-210.
14. Davies, M. 1999. Liquid ventilation. *J Paediatr.Child Health* 35:434-437.

15. Doyle, I. R., K. G. Davidson, H. A. Barr, and T. E. Nicholas. 1998. Quantity and structure of surfactant proteins vary among patients with alveolar proteinosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 157:658-664.
16. Duck-Chong, C. G. 1979. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* 14:492-497.
17. Dunbar III, A. E., S. E. Wert, M. Ikegami, J. A. Whitsett, A. Hamvas, F. V. White, B. Piedboeuf, C. Jobin, S. Guttentag, and L. M. Nogee. 2000. Prolonged Survival in Hereditary Surfactant Protein B (SP-B) Deficiency Associated with a Novel Splicing Mutation. *Pediatr.Res.* 48:275-282.
18. Enhorning, G. and B. A. Holm. 1993. Disruption of pulmonary surfactant's ability to maintain openness of a narrow tube. *J.Appl.Physiol.* 74:2922-2927.
19. Floros, J. and P. Kala. 1998. Surfactant proteins: Molecular Genetics of Neonatal Pulmonary Diseases. *Annu.Rev.Physiol.* 60:365-384.
20. Folch, J., M. Lees, and S. Sloane. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J.Biol.Chem.* 226:497-509.
21. Goldstein, L. S., M. S. Kavuru, P. Curtis-McCarthy, H. A. Christie, C. Farver, and J. K. Stoller. 1998. Pulmonary alveolar proteinosis: clinical features and outcomes. *Chest* 114:1357-1362.
22. Griesse, M. 1999. Pulmonary surfactant in health and lung diseases: state of the art. *Eur.Respir.J.* 13:1455-1476.
23. Griesse, M., L. I. Gobran, and S. A. Rooney. 1991. Surfactant lipid uptake and secretion in type II cells in response to lectins and secretagogues. *Am.J.Physiol.* 261:L434-L442.
24. Griesse, M., L. I. Gobran, and S. A. Rooney. 1993. Signal-transduction mechanisms of ATP-stimulated phosphatidylcholine secretion in rat type II pneumocytes: interactions between ATP and other surfactant secretagogues. *Biochim.Biophys.Acta* 1167:85-93.
25. Griesse, M., M. Tredano, and M. Bahuaui. 2001. Pulmonale Alveolar-Proteinosen: Molekulare Grundlagen und Konsequenzen für Diagnostik und Therapie. *Monatsschr Kinderhkd. Monatsschr.Kinderhkd.*
26. Gustafsson, M., T. Curstedt, H. Jornvall, and J. Johansson. 1997. Reverse-phase HPLC of the hydrophobic pulmonary surfactant proteins: detection of a surfactant protein C isoform containing Nepsilon-palmitoyl-lysine. *Biochem.J* 326 (Pt 3):799-806.
27. Hallman, M., R. Spragg, J. H. Harrell, K. M. Moser, and L. Gluck. 1982. Evidence of lung surfactant abnormality in respiratory failure. Study of bronchoalveolar lavage phospholipids, surface activity, phospholipase activity, and plasma myoinositol. *J.Clin.Invest.* 70:673-683.

28. He, C. 2003. Proteomic analysis of human bronchoalveolar lavage fluid: expression profiling of surfactant-associated protein A isomers derived from human pulmonary alveolar proteinosis using immunoaffinity detection. *Proteomics*. 3:87-94.
29. Heppleston, A. G., M. McDermott, and M. M. Collins. 1975. The surface properties of the lung in rats with alveolar lipo-proteinosis. *Br.J Exp.Pathol.* 56:444-453.
30. Hirschl, R. B., T. Pranikoff, P. Gauger, R. J. Schreiner, R. Dechert, and R. H. Bartlett. 1995. Liquid ventilation in adults, children, and full-term neonates. *Lancet* 346:1201-1202.
31. Hoffmann, A. G., Lawrance, MG, F. Ognibene, A. F. Suffredini, G. Y. Lipschick, and J. Kovacs. 1992. Reduction of pulmonary surfactant in patients with human immunodeficiency virus infection and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest* 102:1730-1736.
32. Holmskov, U., P. Lawson, B. Teisner, I. Tornoe, A. Willus, C. Morgan, C. Koch, and K. Reid. 1997. Isolation and characterization of a new member of the scavenger receptor superfamily, glycoprotein-340 (gp-340), as a lung surfactant protein D binding molecule. *J.Biol.Chem.* 272:13743-13749.
33. Honda, Y., Y. Kuroki, E. Matsuura, H. Nagae, and H. Takahashi. 1995. Pulmonary surfactant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 152:1860-1866.
34. Honda, Y., H. Takahashi, N. Shijubo, Y. Kuroki, and T. Akino. 1993. Surfactant protein A concentration in bronchoalveolar lavage fluids of patients with pulmonary alveolar proteinosis. *Chest* 103:496-499.
35. Jobe, A. H. 1993. Pulmonary surfactant therapy. *N.Engl.J.Med.* 328:861-868.
36. Johansson, J. 1998. Structure and properties of surfactant protein C. *Biochim.Biophys.Acta* 1408:161-172.
37. Johansson, J., T. Curstedt, and B. Robertson. 1999. The proteins of the surfactant system. *Eur.Respir.J.* 7:372-391.
38. Kariman, K., J. A. Kylstra, and A. Spock. 1984. Pulmonary alveolar proteinosis: prospective clinical experience in 23 patients for 15 years. *Lung* 162:223-231.
39. Kavuru, M. S., E. J. Sullivan, R. Piccin, M. J. Thomassen, and J. Stoller. 2000. Exogenous Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Administration for Pulmonary Alveolar Proteinosis. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1143-1148.
40. Kelly, K. P. 1997. Partial liquid ventilation--turning back a PAGE on evolution. *Br.J Anaesth.* 78:1-2.

41. Kitamura, T., K. Uchida, N. Tanaka, T. Tsuchiya, J. Watanabe, Y. Yamada, K. Hanaoka, J. F. Seymour, O. D. Choch, I. R. Doyle, Y. Inoue, M. Sakatani, S. Kudoh, A. Azuma, T. Nukiwa, T. Tomita, M. Katagiri, A. Fujita, T. Kurashima, S. Kanegasaki, and K. Nakata. 2000. Serological diagnosis of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 162:658-662.
42. Krämer, H. J., R. Schmidt, A. Günther, G. Becker, Y. Suzuki, and W. Seeger. 1995. ELISA technique for quantification of surfactant protein B (SP-B) in bronchoalveolar lavage fluid. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 1995:1540-1544.
43. Kuhn, C., F. Gyorkey, B. E. Levine, and J. Ramirez-Rivera. 1966. Pulmonary alveolar proteinosis. A study using enzyme histochemistry, electron microscopy, and surface tension measurement. *Lab Invest* 15:492-509.
44. Kuroki, Y., R. J. Mason, and D. R. Voelker. 1988. Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J.Biol.Chem.* 263:3388-3394.
45. LARSON, R. K. and R. GORDINIER. 1965. Pulmonary Alveolar Proteinosis. Report of six cases, review of the literature and formulation of a new theory. *Ann.Intern.Med.* 62:292-312.
46. Lee, M. G., H. Spencer, W. F. Clarke, B. N. Rao, M. Lowe, and M. Nelson. 1982. Pulmonary alveolar proteinosis in Jamaica. *West Indian Med.J* 31:103-110.
47. Madan, T., P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S. S. Aggrawal, P. U. Sarma, and K. M. Reid. 1997. Binding of surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect.Immun.* 65:3171-3179.
48. Magi, B., L. Bini, M. G. Perari, A. Fossi, J. C. Sanchez, D. Hochstrasser, S. Paesano, R. Raggiaschi, A. Santucci, V. Pallini, and P. Rottoli. 2002. Bronchoalveolar lavage fluid protein composition in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a two-dimensional electrophoretic study. *Electrophoresis* 23:3434-3444.
49. Marraro, G., M. Bonati, A. Ferrari, M. M. Barzaghi, C. Pagani, A. Bortolotti, A. Galbiati, M. Luchetti, and A. Croce. 1998. Perfluorocarbon broncho-alveolar lavage and liquid ventilation versus saline broncho-alveolar lavage in adult guinea pig experimental model of meconium inhalation. *Intensive Care Med.* 24:501-508.
50. Martin, R. J., R. M. Rogers, and N. M. Myers. 1978. Pulmonary alveolar proteinosis: shunt fraction and lactic acid dehydrogenase concentration as aids to diagnosis. *Am Rev.Respir.Dis.* 117:1059-1062.
51. Mason, R. J., L. G. Dobbs, R. D. Greenleaf, and M. C. Williams. 1977. Alveolar type II cells. *Fed.Proc.* 36:2697-2702.
52. Michel Laguerre. Institut Européen de Chimie & Biologie, IECB, Pessac, France.

53. Nogee, L., A. E. Dunbar III, S. Wert, F. Askin, A. Hamvas, and Whitsett J.A. 2002. Mutations in the surfactant protein C gene associated with interstitial lung disease. *Chest* 121:20S-21S.
54. Nogee, L., A. E. Dunbar III, S. Wert, R. Askin, A. Hamvas, and J. A. Whitsett. 2001. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N.Engl.J.Med.* 344:573-579.
55. Nogee, L. M., D. E. de Mello, L. P. Dehner, and H. R. Colten. 1993. Brief-report: deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N.Engl.J.Med.* 328:406-410.
56. Nogee, L. M., S. E. Wert, S. A. Proffitt, W. M. Hull, and J. A. Whitsett. 2000. Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 161:973-981.
57. Onodera, T., M. Nakamura, T. Sato, and T. Akino. 1983. Biochemical characterization of pulmonary washings of patients with alveolar proteinosis, interstitial pneumonitis and alveolar cell carcinoma. *Tohoku J Exp.Med.* 139:245-263.
58. Perez-Gil, J. 2001. Lipid-protein interactions of hydrophobic proteins SP-B and SP-C in lung surfactant assembly and dynamics. *Pediatr.Pathol.Mol.Med.* 20:445-469.
59. Pohunek, P., H. Pokorna, and I. Striz. 1996. Comparison of cell profiles in separately evaluated fractions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in children. *Thorax* 51:615-618.
60. Ramirez, R. and W. R. Harlan. 1968. Pulmonary alveolar proteinosis. Nature and origin of alveolar lipid. *Am.J.Med.* 45:502-512.
61. Riedler, J., J. Grigg, C. Stone, G. Tauro, and C. Robertson. 1995. Bronchoalveolar lavage cellularity in healthy children. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.* 152:163-168.
62. Robertson, B., L. G. van Golde, and J. J. Batenburg. 1992. Pulmonary surfactant: from molecular biology to clinical practice Elsevier, Amsterdam.
63. ROSEN, S. H., B. CASTLEMAN, and A. A. LIEBOW. 1958. Pulmonary alveolar proteinosis. *N.Engl.J Med.* 258:1123-1142.
64. Rupp, G. H., K. Wasserman, M. Ogawa, and D. C. Heiner. 1973. Bronchopulmonary fluids in pulmonary alveolar proteinosis. *J Allergy Clin.Immunol.* 51:227-237.
65. Schoch, O. D., U. Schanz, M. Koller, K. Nakata, J. F. Seymour, E. W. Russi, and A. Boehler. 2002. BAL findings in a patient with pulmonary alveolar proteinosis successfully treated with GM-CSF. *Thorax* 57:277-280.

66. Selecky, P. A., K. Wasserman, J. R. Benfield, and M. Lippmann. 1977. The clinical and physiological effect of whole-lung lavage in pulmonary alveolar proteinosis: a ten-year experience. *Ann. Thorac. Surg.* 24:451-461.
67. Seymour, J. F., A. R. Dunn, J. Vincent, J. Presneili, and M. Pain. 1996. Efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in acquired alveolar proteinosis. *N. Engl. J. Med.* 335:1924-1925.
68. Seymour, J. F. and J. J. Presneill. 2002. Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir. Crit Care Med.* 166:215-235.
69. Seymour, J. F., J. J. Presneill, O. D. Schoch, G. H. Downie, P. E. Moore, I. R. Doyle, J. M. Vincent, K. Nakata, T. Kitamura, D. Langton, M. C. Pain, and A. R. Dunn. 2001. Therapeutic efficacy of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with idiopathic acquired alveolar proteinosis. *Am J Respir. Crit Care Med.* 163:524-531.
70. Shah, P. L., D. Hansell, P. R. Lawson, K. Reid, and C. Morgan. 2000. Pulmonary alveolar proteinosis: clinical aspects and current concepts on pathogenesis. *Thorax* 55:67-77.
71. Shimizu, H., J. H. Fisher, P. Papst, B. Benson, K. Lau, R. J. Mason, and D. R. Voelker. 1992. Primary structure of rat pulmonary surfactant protein D. cDNA and deduced amino acid sequence. *J Biol. Chem.* 267:1853-1857.
72. Signor, L., B. Tigani, N. Beckmann, R. Falchetto, and M. Stoeckli. 2004. Two-dimensional electrophoresis protein profiling and identification in rat bronchoalveolar lavage fluid following allergen and endotoxin challenge. *Proteomics.* 4:2101-2110.
73. Southern, K. W., W. K. Funkhouser, I. Kazachkova, V. L. Godfrey, L. A. Fordham, J. T. Gatzky, and P. M. Barker. 2002. Airway surface liquid recovered by lavage with perfluorocarbon liquid in cats. *Eur. J Clin. Invest* 32:956-961.
74. Stahlman, M. T., M. P. Gray, M. W. Falconieri, J. A. Whitsett, and T. E. Weaver. 2000. Lamellar body formation in normal and surfactant protein B-deficient fetal mice. *Lab Invest* 80:395-403.
75. Ten Brinke, A., L. M. G. Van Golde, and J. J. Batenburg. 2000. Palmitoylation and processing of the lipopeptide surfactant protein C. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA MOL. CELL BIOL. LIPIDS* 1583:253-265.
76. Tredano, M., M. Griesse, F. Brasch, S. Schumacher, J. de Blic, S. Marque, C. Houdayer, J. Elion, R. Couderc, and M. Bahuau. 2004. Mutation of SFTPC in infantile pulmonary alveolar proteinosis with or without fibrosing lung disease. *Am J Med. Genet.* 126A:18-26.
77. Tredano, M., R. M. van Elburg, A. G. Kaspers, L. J. Zimmermann, C. Houdayer, P. Aymard, W. M. Hull, J. A. Whitsett, J. Elion, M. Griesse, and M. Bahuau. 1999. Compound SFTPB 1549C-GAA (121ins2) and 457delC heterozygosity in severe congenital lung disease and surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Hum Mutat* 14:502-509.

78. van Eijk, M., C. G. De Haas, and H. P. Haagsman. 1995. Quantitative analysis of pulmonary surfactant proteins B and C. *Anal.Biochem.*
79. van Golde, L. G., J. J. Batenburg, and B. Robertson. 1988. The pulmonary surfactant system: biochemical aspects and functional significance. *Physiol.Reviews* 68:374-455.
80. Veldhuizen, R. A. W., J. Lee, D. Sandler, W. Hull, J. A. Whitsett, J. Lewis, F. Possmayer, and R. J. Novick. 1993. Alterations in pulmonary surfactant composition and activity after experimental lung transplantation. *Am Rev Respir Dis* 148:208-215.
81. Wattiez, R., C. Hermans, A. Bernard, O. Lesur, and P. Falmagne. 1999. Human bronchoalveolar lavage fluid: two-dimensional gel electrophoresis, amino acid micro-sequencing and identification of major proteins. *Electrophoresis* 20:1634-1645.
82. Wattiez, R., Hermans.C., C. Cruyt, A. Bernard, and P. Falmagne. 2000. Human bronchoalveolar lavage fluid protein two-dimensional database: study of interstitial lung disease. *Electrophoresis* 21:2703-2712.
83. Weaver, T. E. and J. J. Conkright. 2001. Functions of surfactant proteins B and C. *Ann.Rev.Physiol.* 63:555-579.
84. Wilson, J. W., A. R. Rubinfeld, A. White, and M. Mullerworth. 1986. Alveolar proteinosis treated with a single bronchial lavage. *Med.J Aust.* 145:158-160.
85. Wright, J. R. 1997. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol.Reviews* 77:931-961.
86. Young, S. L., S. A. Kremers, J. S. Apple, J. D. Crapo, and G. W. Brumley. 1981. Rat lung surfactant kinetics: biochemical and morphometric correlation. *J.Appl.Physiol.* 51:248-253.

VI.B. Tabellen

Therapeutische Halblungenlavagen

Gesamt (µg/ml)

[illegible]

Gesamt/Körpergewicht (µg/ml/kg)

[illegible]

Pool (μg/ml)

[illegible]

Pool/Körpergewicht (µg/ml/kg)

[illegible]

[illegible][illegible]

Proteingesamtmenge

Gesamt (g)

[illegible]

Gesamt/Körpergewicht (g/kg)

[illegible]

Pool (μg)[illegible]

Pool/Körpergewicht (μg)

[illegible]

Halblungenlavagen (g)

[illegible]

Halblungenlavagen/Körpergewicht (g/kg)

[illegible]

Phospholipidkonzentration

Gesamt (µg/ml)

[illegible]

Gesamt/Körpergewicht (µg/ml/kg)

[illegible]

[illegible][illegible]

Halblungenlavagen (µg/ml)

[illegible]

Halblungenlavagen/Körpergewicht (µg/ml/kg)

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

[illegible][illegible]

Gesamt (ng/ml)

[illegible][illegible]

Pool (ng/ml)

[illegible]

Pool/Körpergewicht (ng/ml/kg)

[illegible]

[illegible][illegible]

Gesamt (ng)

Gesamt/Körpergewicht (ng/kg)[illegible]

[illegible][illegible]

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	7982363000	10157780000	85097260	26898620	1779681000	169235800	8486616	66313550	114103000	27395180	80748250	77160	25086	169419
	356506500	9608480000	48948060	200341100	392226900	764047400							842332	128620
			41194480	32705220	333821400	1628095000							223660	172139
													76458	168207
													126974	148358
Minimum	356500000	9608000000	41190000	26900000	333800000	169200000	8487000	66310000	114100000	27400000	80750000	77160	25086	128620
25% Percentile													50772	138489
Median	4169000000	9883000000	48950000	32710000	392200000	764000000	8487000	66310000	114100000	27400000	80750000	77160	126974	168207
75% Percentile													532996	170779
Maximum	7982000000	10160000000	85100000	200300000	1780000000	1628000000	8487000	66310000	114100000	27400000	80750000	77160	842332	172139
Mittelwert	4169000000	9883000000	58410000	86650000	835200000	853800000	8487000	66310000	114100000	27400000	80750000	77160	258902	157349
Standard-abweichung	5392000000	388400000	23430000	98500000	818400000	733600000	0	0	0	0	0	0	334288	18631
Standard-fehler	3813000000	274700000	13530000	56870000	472500000	423500000	0	0	0	0	0	0	149498	8332
unteres 95% CI (Mittelwert)	44280000000	6393000000	205322	158000000	1198000000	968500000	0	0	0	0	0	0	15617	134215
oberes 95% CI (Mittelwert)	52620000000	13370000000	116600000	331300000	2868000000	2676000000	0	0	0	0	0	0	673977	180483

[illegible]

[illegible]

[illegible][illegible]

SP-D Gesamtmenge

Gesamt (ng)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	522801	397275	51376	31826	57985	62868	7809	17420	12882	13031	85	23	412	314
	5212020	60406	89479	44776	90633	38572							491	204
			40405	91651	34777	122247							885	157
			82992	12235									317	350
			82035	37685									271	1735
			22943											
Minimum	522801	60406	22943	12235	34777	38572	7809	17420	12882	13031	85	23	271	157
25% Percentile			31674	22031									294	180
Median	2867000	228840	66705	37685	57985	62868	7809	17420	12882	13031	85	23	412	314
75% Percentile			86235	68214									688	1043
Maximum	5212000	397275	89479	91651	90633	122247	7809	17420	12882	13031	85	23	885	1735
Mittelwert	2867000	228840	61538	43635	61132	74563	7809	17420	12882	13031	85	23	475	552
Standard- abweichung	3316000	238203	27205	29443	28061	43046	0	0	0	0	0	0	244	666
Standard- fehler	2345000	168435	11106	13167	16201	24852	0	0	0	0	0	0	109	298
unteres 95% CI (Mittelwert)	-26920000	-1911000	32989	7076	-8575	-32369	0	0	0	0	0	0	172	-275
oberes 95% CI (Mittelwert)	32660000	2369000	90088	80194	130838	181494	0	0	0	0	0	0	779	1379

Gesamt/Körpergewicht (ng/kg)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	7469	5675	6044	3744	3999	4336	1735	3871	2996	3031	7	2	32	37
	74457	863	10527	5268	6251	2660							25	29
			4754	10783	2398	8431							55	16
			9764	1439									29	32
			9651	4434									25	48
	7469	5675	6044	3744	3999	4336	1735	3871	2996	3031	7	2	32	37
Minimum	7469	863	4754	1439	2398	2660	1735	3871	2996	3031	7	2	25	16
25% Percentile			5399	2592									25	22
Median	40963	3269	9651	4434	3999	4336	1735	3871	2996	3031	7	2	29	32
75% Percentile			10145	8025									43	43
Maximum	74457	5675	10527	10783	6251	8431	1735	3871	2996	3031	7	2	55	48
Mittelwert	40963	3269	8148	5134	4216	5142	1735	3871	2996	3031	7	2	33	32
Standard- abweichung	47368	3403	2573	3464	1935	2969	0	0	0	0	0	0	13	12
Standard- fehler	33494	2406	1151	1549	1117	1714	0	0	0	0	0	0	6	5
unteres 95% CI (Mittelwert)	-384623	-27305	4953	833	-591	-2232	0	0	0	0	0	0	17	18
oberes 95% CI (Mittelwert)	466549	33843	11343	9435	9023	12517	0	0	0	0	0	0	49	47

Pool (ng)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	3639	3975	1526	560	144	851	214	188	299	357	85	23	412	314
	37270	1737	693	537	1542	976							491	204
			189	1671	714	908							885	157
			1847	281									317	350
			638	441									271	1735
			1568											
Minimum	3639	1737	189	281	144	851	214	188	299	357	85	23	271	157
25% Percentile			414	361									294	180
Median	20454	2856	1110	537	714	908	214	188	299	357	85	23	412	314
75% Percentile			1707	1115									688	1043
Maximum	37270	3975	1847	1671	1542	976	214	188	299	357	85	23	885	1735
Mittelwert	20454	2856	1077	698	800	912	214	188	299	357	85	23	475	552
Standard- abweichung	23780	1582	658	555	703	62	0	0	0	0	0	0	244	666
Standard- fehler	16815	1119	269	248	406	36	0	0	0	0	0	0	109	298
unteres 95% CI (Mittelwert)	-193204	-11360	387	9	-947	757	0	0	0	0	0	0	172	-275
oberes 95% CI (Mittelwert)	234113	17072	1767	1387	2546	1067	0	0	0	0	0	0	779	1379

Pool/Körpergewicht (ng)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	52	57	179	66	10	59	48	42	69	83	7	2	32	37
	532	25	82	63	106	67							25	29
			22	197	49	63							55	16
			217	33									29	32
			75	52									25	48
			184											
Minimum	52	25	22	33	10	59	48	42	69	83	7	2	25	16
25% Percentile			49	42									25	22
Median	292	41	131	63	49	63	48	42	69	83	7	2	29	32
75% Percentile			201	131									43	43
Maximum	532	57	217	197	106	67	48	42	69	83	7	2	55	48
Mittelwert	292	41	127	82	55	63	48	42	69	83	7	2	33	32
Standard- abweichung	340	23	77	65	48	4	0	0	0	0	0	0	13	12
Standard- fehler	240	16	32	29	28	2	0	0	0	0	0	0	6	5
unteres 95% CI (Mittelwert)	-2760	-162	46	1	-65	52	0	0	0	0	0	0	17	18
oberes 95% CI (Mittelwert)	3344	244	208	163	176	74	0	0	0	0	0	0	49	47

Halblungenlavagen (ng)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	519162	393300	49850	31266	57840	62016	7595	17232	12582	12674	7952	23	412	314
	5174750	58668	88785	44239	89091	37596							491	204
			40216	89980	34063	121340							885	157
			81144	11954									317	350
			81396	37244									271	1735
			21375											
Minimum	519162	58668	21375	11954	34063	37596	7595	17232	12582	12674	7952	23	271	157
25% Percentile			30796	21610									294	180
Median	2847000	225984	65497	37244	57840	62016	7595	17232	12582	12674	7952	23	412	314
75% Percentile			85091	67110									688	1043
Maximum	5175000	393300	88785	89980	89091	121340	7595	17232	12582	12674	7952	23	885	1735
Mittelwert	2847000	225984	60461	42937	60331	73651	7595	17232	12582	12674	7952	23	475	552
Standard- abweichung	3292000	236620	27271	28911	27598	43067	0	0	0	0	0	0	244	666
Standard- fehler	2328000	167316	11133	12929	15934	24865	0	0	0	0	0	0	109	298
unteres 95% CI (Mittelwert)	-26730000	-1900000	31842	7039	-8227	-33333	0	0	0	0	0	0	172	-275
oberes 95% CI (Mittelwert)	32420000	2352000	89080	78834	128889	180634	0	0	0	0	0	0	779	1379

Halblungenlavagen/Körpergewicht (ng/kg)

	PAP adult		J01		J02		J03		J04		C01		Kontrollen	
	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts	links
	7417	5619	5865	3678	3989	4277	1688	3829	2926	2947	612	2	32	37
	73925	838	10445	5205	6144	2593							25	29
			4731	10586	2349	8368							55	16
			9546	1406									29	32
			9576	4382									25	48
			2515											
Minimum	7417	838	2515	1406	2349	2593	1688	3829	2926	2947	612	2	25	16
25% Percentile			3623	2542									25	22
Median	40671	3228	7706	4382	3989	4277	1688	3829	2926	2947	612	2	29	32
75% Percentile			10011	7895									43	43
Maximum	73925	5619	10445	10586	6144	8368	1688	3829	2926	2947	612	2	55	48
Mittelwert	40671	3228	7113	5051	4161	5079	1688	3829	2926	2947	612	2	33	32
Standard- abweichung	47029	3380	3208	3401	1903	2970	0	0	0	0	0	0	13	12
Standard- fehler	33254	2390	1310	1521	1099	1715	0	0	0	0	0	0	6	5
unteres 95% CI (Mittelwert)	-381863	-27142	3746	828	-567	-2299	0	0	0	0	0	0	17	18
oberes 95% CI (Mittelwert)	463205	33599	10480	9275	8889	12458	0	0	0	0	0	0	49	47

Auswaschkinetik

Protein Einzelwerte

Patient	Lavagedatum, Lavageseite	Spülportion	Volumen (ml)	Konzentration (µg/ml)	Gesamtmenge je Spülportion (µg)	% gesamt (%)
J01	1.10.01 links	Pool	36	284,96	10258,60	97,22
		1	540	325,80	175932,00	49,54
		2	385	122,84	47293,40	36,72
		3	490	98,09	48064,10	23,69
		4	500	82,97	41485,00	12,45
		5	490	58,36	28596,40	4,70
		6	270	64,23	17342,10	0,00
	1.10.01 rechts	Pool	36	218,31	7859,20	97,11
		1	515	247,81	127622,20	50,18
		2	490	108,31	53071,90	30,67
		3	485	105,79	51308,20	11,80
		4	425	75,50	32087,50	0,00
	05.06.00 rechts	Pool	36	247,00	8892,00	98,59
		1	421	525,31	221155,50	63,58
		2	480	266,20	127776,00	43,36
		3	494	184,75	91266,50	28,91
		4	489	139,14	68039,50	18,14
		5	475	115,82	55014,50	9,43
		6	573	103,93	59551,90	0,00
	07.06.00 links	Pool	36	324,30	11674,80	97,00
		1	474	318,79	151106,50	58,21
		2	472	233,25	110094,00	29,95
		3	490	71,98	35270,20	20,90
		4	488	48,83	23829,00	14,78
		5	486	59,80	29062,80	7,32
		6	480	59,44	28531,20	0,00
	14.08.00 rechts	Pool	36	192,67	6936,10	98,00
		1	457	283,96	129769,70	60,61
		2	490	124,54	61024,60	43,03
		3	492	89,99	44275,10	30,27
		4	488	74,73	36468,20	19,76
		5	462	79,08	36535,00	9,23
		6	508	63,08	32044,60	0,00
	11.12.00 rechts	Pool	36	196,32	7067,50	98,71
		1	420	309,52	129998,40	74,89
		2	397	282,91	112315,30	54,31
		3	500	450,31	225155,00	13,06
		4	484	147,29	71288,40	0,00

	05.09.01 links	Pool	36	285,33	10271,90	97,44
		1	495	215,05	106449,80	70,91
		2	510	88,30	45033,00	59,68
		3	500	80,62	40310,00	49,63
		4	590	41,03	24207,70	43,60
		5	585	96,47	56435,00	29,53
		6	488	56,68	27659,80	22,64
		7	585	47,95	28050,80	15,65
		8	485	81,36	39459,60	5,81
		9	490	47,58	23314,20	0,00
	28.03.01 links	Pool	36	192,46	6928,60	98,13
		1	500	150,57	75285,00	77,80
		2	510	112,16	57201,60	62,36
		3	550	109,26	60093,00	46,14
		4	490	49,70	24353,00	39,56
		5	585	86,37	50526,50	25,92
		6	500	31,97	15985,00	21,61
		7	695	25,33	17604,40	16,85
		8	550	17,38	9559,00	14,27
		9	560	26,23	14688,80	10,31
		10	550	35,14	19327,00	5,09
		11	490	26,18	12828,20	1,63
		12	320	18,82	6022,40	0,00
	16.08.00 links	Pool	36	615,30	22150,80	93,78
		1	472	234,85	110849,20	62,67
		2	471	96,07	45249,00	49,97
		3	492	133,12	65495,00	31,58
		4	485	79,41	38513,90	20,77
		5	484	50,95	24659,80	13,85
		6	479	49,93	23916,50	7,14
		7	333	76,39	25437,90	0,00
	25.09.00 rechts	Pool	36	200,00	7200,00	98,16
		1	458	267,45	122492,10	66,83
		2	475	116,95	55551,30	52,62
		3	490	83,88	41101,20	42,11
		4	475	86,74	41201,50	31,57
		5	512	108,12	55357,40	17,41
		6	487	93,44	45505,30	5,77
		7	510	44,24	22562,40	0,00
	27.09.00 links	Pool	36	209,73	7550,30	98,64
		1	495	427,05	211389,80	60,51
		2	520	154,36	80267,20	46,03
		3	500	123,47	61735,00	34,89
		4	510	108,04	55100,40	24,95
		5	490	61,84	30301,60	19,48

		6	485	60,54	29361,90	14,19
		7	460	61,96	28501,60	9,05
		8	485	64,47	31268,00	3,41
		9	420	44,95	18879,00	0,00
	07.05.01 rechts	Pool	36	268,06	9650,20	97,40
		1	525	259,52	136248,00	60,73
		2	500	103,05	51525,00	46,86
		3	400	84,91	33964,00	37,72
		4	500	71,59	35795,00	28,08
		5	520	52,21	27149,20	20,77
		6	585	71,82	42014,70	9,46
		7	500	38,75	19375,00	4,25
		8	310	50,92	15785,20	0,00
	09.05.01 links	Pool	36	167,79	6040,40	98,00
		1	492	128,89	63413,90	77,04
		2	500	85,92	42960,00	62,84
		3	500	78,52	39260,00	49,86
		4	485	46,03	22324,60	42,48
		5	490	46,36	22716,40	34,97
		6	500	36,40	18200,00	28,96
		7	390	34,60	13494,00	24,49
		8	480	39,02	18729,60	18,30
		9	460	25,90	11914,00	14,36
		10	490	41,36	20266,40	7,66
		11	590	39,30	23187,00	0,00
	15.05.02 rechts	Pool	36	289,39	10418,00	97,59
		1	545	421,51	229723,00	44,34
		2	582	173,13	100761,70	20,98
		3	537	110,36	59263,30	7,24
		4	293	106,62	31239,70	0,00
	18.06.01 rechts	Pool	36	248,93	8961,50	97,21
		1	540	282,85	152739,00	49,59
		2	520	103,87	54012,40	32,75
		3	435	59,82	26021,70	24,63
		4	480	54,40	26112,00	16,49
		5	590	53,93	31818,70	6,57
		6	420	50,19	21079,80	0,00
	20.06.01 links	Pool	36	164,58	5924,90	97,19
		1	535	154,41	82609,40	58,08
		2	480	40,01	19204,80	48,99
		3	500	42,11	21055,00	39,02
		4	484	56,67	27428,30	26,04
		5	425	54,47	23149,80	15,08
		6	500	29,16	14580,00	8,18

		7	600	28,78	17268,00	0,00
	6.11.00 rechts	Pool	36	660,43	23775,50	91,07
		1	420	294,04	123496,80	44,70
		3	590	122,27	72139,30	17,61
		5	580	69,83	40501,40	2,40
		7	185	34,58	6397,30	0,00
	8.11.00 links	Pool	36	208,17	7494,10	96,38
		1	502	181,18	90952,40	52,41
		3	569	74,60	42447,40	31,90
		5	591	40,51	23941,40	20,32
		7	597	44,41	26512,80	7,51
		9	494	31,45	15536,30	0,00
	8.5.00 rechts	Pool	36	161,86	5827,00	98,58
		1	442	339,92	150244,60	61,91
		2	500	203,39	101695,00	37,08
		3	480	83,20	39936,00	27,34
		4	495	41,40	20493,00	22,33
		5	500	86,62	43310,00	11,76
		6	500	49,54	24770,00	5,72
		7	498	47,04	23425,90	0,00
	24.1.00 rechts	Pool	36	204,88	7375,70	95,91
		1	447	122,35	54690,50	65,58
		2	403	87,85	35403,60	45,94
		3	446	100,48	44814,10	21,09
		4	183	207,79	38025,60	0,00
J02	06.12.00 links	0	36	1078,65	38831,40	98,59
		1	512	2615,08	1338920,96	50,06
		2	439	1749,28	767933,92	22,22
		3	490	312,60	153174,00	16,67
		4	430	722,62	310726,60	5,41
		5	208	717,43	149225,44	0,00
	11.12.00 links	0	36	1155,23	41588,28	97,60
		1	481	1715,63	825218,03	49,93
		2	493	426,23	210131,39	37,79
		3	580	299,43	173669,40	27,76
		4	461	537,49	247782,89	13,45
		5	428	292,37	125134,36	6,22
		6	412	186,50	76838,00	1,78
		7	205	150,29	30809,45	0,00
	22.02.01 rechts	0	36	1143,20	41155,20	98,39
		1	466	2413,83	1124844,78	54,51
		2	483	467,58	225841,14	45,69

		3	572	375,09	214551,48	37,32
		4	529	1349,73	714007,17	9,46
		5	540	178,36	96314,40	5,70
		6	472	185,20	87414,40	2,29
		7	305	192,77	58794,85	0,00
	27.6.01 rechts	0	36	531,19	19122,84	99,48
		1	400	3874,63	1549852,00	57,65
		2	250	2498,40	624600,00	40,79
		3	300	1411,36	423408,00	29,36
		4	270	893,97	241371,90	22,84
		5	320	511,95	163824,00	18,42
		6	550	489,42	269181,00	11,15
		7	550	311,38	171259,00	6,53
		8	550	267,23	146976,50	2,56
		9	300	140,51	42153,00	1,42
		10	300	175,69	52707,00	0,00
	29.6.01 links	0	36	1998,13	71932,68	97,76
		1	485	3725,83	1807027,55	41,54
		2	500	1372,39	686195,00	20,19
		3	508	500,55	254279,40	12,28
		4	495	381,56	188872,20	6,41
		5	500	212,85	106425,00	3,10
		6	500	199,09	99545,00	0,00
	3.1.02 links	0	36	5372,83	193421,88	95,94
		1	500	4954,58	2477290,00	43,88
		2	608	1371,04	833592,32	26,37
		3	554	663,92	367811,68	18,64
		4	612	500,70	306428,40	12,20
		5	700	200,07	140049,00	9,26
		6	646	159,73	103185,58	7,09
		7	693	126,71	87810,03	5,25
		8	597	127,84	76320,48	3,64
		9	585	79,18	46320,30	2,67
		10	592	110,25	65268,00	1,30
		11	593	77,67	46058,31	0,33
		12	194	81,22	15756,68	0,00
	7.1.02 rechts	0	36	3860,50	138978,00	97,46
		1	170	14076,00	2392920,00	53,66
		2	590	2476,85	1461341,50	26,91
		3	425	781,92	332316,00	20,83
		4	445	541,73	241069,85	16,42
		5	450	361,63	162733,50	13,44
		6	450	346,33	155848,50	10,59
		7	475	252,02	119709,50	8,40
		8	600	268,24	160944,00	5,45

		9	565	326,22	184314,30	2,08
		10	420	270,37	113555,40	0,00
	28.2.02 rechts	0	36	1628,26	58617,36	95,66
		1	170	1392,63	236747,10	78,13
		2	590	541,58	319532,20	54,47
		3	425	623,17	264847,25	34,86
		4	445	155,79	69326,55	29,72
		5	450	364,10	163845,00	17,59
		6	450	178,39	80275,50	11,64
		7	435	164,53	71570,55	6,35
		8	320	267,77	85686,40	0,00
	8.8.02 rechts	0	36	1322,87	47623,32	97,31
		1	540	1887,06	1019012,40	39,84
		2	541	691,56	374133,96	18,74
		3	483	362,21	174947,43	8,88
		4	495	172,14	85209,30	4,07
		5	490	105,58	51734,20	1,15
		6	190	107,74	20470,60	0,00
	8.8.02 links	0	36	1591,27	57285,72	97,47
		1	485	1607,05	779419,25	63,01
		2	600	944,30	566580,00	37,96
		3	500	617,67	308835,00	24,31
		4	508	526,04	267228,32	12,49
		5	507	324,09	164313,63	5,23
		6	502	166,37	83517,74	1,53
		7	200	173,58	34716,00	0,00
	29.11.02 rechts	0	36	1638,42	58983,12	97,75
		1	720	2028,74	1460692,80	41,96
		2	400	1087,2	434880,00	25,35
		3	500	625,49	312745,00	13,41
		4	400	499,15	199660,00	5,78
		5	225	672,84	151389,00	0,00
	29.11.02 links	0	36	3713,51	133686,36	97,35
		1	450	4523,00	2035350,00	57,04
		2	600	2293,09	1375854,00	29,79
		3	600	1009,85	605910,00	17,79
		4	555	689,27	382544,85	10,21
		5	600	458,60	275160,00	4,76
		6	590	332,07	195921,30	0,88
		7	420	105,72	44402,40	0,00
	12.3.03 links	0	36	8780,00	316080,00	93,45
		1	530	2820,50	1494865,00	62,47
		2	450	1557,30	700785,00	47,95

		3	550	1013,00	557150,00	36,41
		4	600	705,80	423480,00	27,63
		5	560	500,50	280280,00	21,82
		6	200	794,30	158860,00	18,53
		7	200	464,90	92980,00	16,60
		8	200	442,70	88540,00	14,77
		9	600	377,30	226380,00	10,08
		10	400	505,27	202108,00	5,89
		11	400	315,70	126280,00	3,27
		12	415	380,60	157949,00	0,00
	14.3.03 rechts	0	36	642,20	23119,20	99,69
		1	445	6184,70	2752191,50	62,70
		2	490	3325,90	1629691,00	40,79
		3	500	1907,80	953900,00	27,97
		4	450	588,40	264780,00	24,41
		5	495	626,19	309964,05	20,24
		6	490	534,30	261807,00	16,73
		7	290	424,80	123192,00	15,07
		8	100	435,80	43580,00	14,48
		9	100	601,40	60140,00	13,68
		10	100	455,50	45550,00	13,06
		11	90	631,80	56862,00	12,30
		12	85	226,70	19269,50	12,04
		13	485	417,90	202681,50	9,32
		14	490	360,10	176449,00	6,94
		15	490	282,04	138199,60	5,09
		16	480	326,11	156532,80	2,98
		17	565	281,84	159239,60	0,84
		18	100	175,40	17540,00	0,61
		19	120	376,04	45124,80	0,00
	17.3.03 links	0	36	443,30	15958,80	99,64
		1	470	3390,00	1593300,00	63,61
		2	580	2640,00	1531200,00	28,98
		3	600	504,80	302880,00	22,13
		4	540	272,14	146955,60	18,81
		5	435	246,03	107023,05	16,39
		6	590	181,04	106813,60	13,97
		7	395	156,83	61947,85	12,57
		8	200	179,40	35880,00	11,76
		9	100	245,60	24560,00	11,21
		10	100	333,30	33330,00	10,45
		11	100	254,70	25470,00	9,88
		12	160	586,40	93824,00	7,75
		13	580	179,40	104052,00	5,40
		14	600	188,50	113100,00	2,84
		15	635	134,40	85344,00	0,91
		16	390	103,60	40404,00	0,00

J03	4.12.02 rechts	Pool	20,00	1041,60	20832,00	99,87
		1	114,50	2082,26	238418,77	63,83
		2	96,00	4165,00	399840,00	0,00
	5.12.02 links	Pool	19,00	1026,66	19506,54	98,36
		1	39,00	2482,48	96816,72	90,19
		2	59,00	4470,80	263777,20	67,95
		3	37,00	5975,38	221089,06	62,80
		4	42,00	4088,78	171728,76	34,82
		5	19,00	2128,67	40444,73	31,41
		6	34,00	4308,27	146481,18	19,06
		7	37,00	4108,28	152006,36	6,24
		8	24,00	3082,55	73981,20	0,00
J04	7.12.01 rechts	Pool	15,00	572,99	8594,85	96,99
		1	463,00	447,89	207373,07	24,42
		2	490,00	142,41	69780,90	0,00
	19.12.01 links	Pool	12,50	130,60	1632,50	98,99
		1	249,00	282,94	70452,06	55,21
		2	262,00	123,80	32435,60	35,06
		3	300,00	83,68	25104,00	19,46
		4	245,00	127,81	31313,45	0,00
A04	2.4.03 rechts	1	1000,00	5318,10	5318100	65,41
		2	1000,00	3107,80	3107800	45,20
		3	1000,00	1504,30	1504300	35,41
		4	1000,00	1403,90	1403900	26,28
		5	1000,00	830,60	830600	20,88
		6	1000,00	455,72	455720	17,91
		7	1000,00	324,20	324200	18,77
		8	1000,00	257,92	257920	14,13
		9	1000,00	257,16	257160	12,45
		10	1000,00	170,30	170300	11,35
		11	1000,00	140,46	140460	10,43
		12	1000,00	139,88	139880	9,52
		13	1000,00	131,34	131340	8,67
		14	1000,00	113,32	113320	7,93
		15	1000,00	103,74	103740	7,26
		16	1000,00	94,50	94500	6,64
		17	1000,00	102,08	102080	5,98
		18	1000,00	112,66	112660	5,24
		19	1000,00	89,29	89290	4,66
		20	1000,00	103,97	103970	3,99
		21	1000,00	92,16	92160	3,39
		22	1000,00	89,01	89010	2,81
		23	1000,00	83,13	83130	2,27
		24	1000,00	81,50	81500	1,74

		25	1000,00	88,14	88140	1,17
		26	1000,00	88,37	88370	0,59
		27	1000,00	90,78	90780	0,00
A05	5.5.03 links	1	1000,00	477,90	477900	84,44
		2	1000,00	419,48	419480	70,78
		3	1000,00	368,72	368720	58,77
		4	1000,00	379,59	379590	46,41
		5	1000,00	274,04	274040	37,49
		6	1000,00	233,89	233890	29,87
		7	1000,00	126,39	126390	28,82
		8	1000,00	111,85	111850	22,11
		9	1000,00	93,09	93090	19,08
		10	1000,00	68,73	68730	16,84
		11	1000,00	83,78	83783	14,12
		12	1000,00	66,96	66960	11,94
		13	1000,00	51,58	51580	10,26
		14	1000,00	45,62	45620	8,77
		15	1000,00	45,58	45580	7,29
		16	1000,00	61,03	61030	5,30
		17	1000,00	40,21	40210	3,99
		18	1000,00	51,71	51710	2,31
		19	1000,00	40,70	40700	0,98
		20	1000,00	30,11	30110	0,00
	27.5.03 rechts	1	1000,00	573,60	573600	85,86
		2	1000,00	639,47	639470	70,09
		3	1000,00	328,08	328080	62,00
		4	1000,00	364,73	364730	53,01
		5	1000,00	437,93	437930	42,21
		6	1000,00	271,62	271620	35,51
		7	1000,00	187,50	187500	30,83
		8	1000,00	114,89	114890	28,06
		9	1000,00	121,30	121300	25,07
		10	1000,00	119,83	119830	22,11
		11	1000,00	71,34	71340	20,35
		12	1000,00	85,89	85890	18,24
		13	1000,00	92,84	92840	15,95
		14	1000,00	81,97	81970	13,93
		15	1000,00	58,75	58750	12,48
		16	1000,00	57,92	57920	11,05
		17	1000,00	67,53	67530	9,39
		18	1000,00	57,99	57990	7,96
		19	1000,00	68,53	68530	6,27
		20	1000,00	49,87	49870	5,04
		21	1000,00	50,70	50700	3,79
		22	1000,00	39,91	39910	2,80
		23	1000,00	53,47	53470	1,48
		24	1000,00	60,19	60190	0,00

A06	2.10.03 rechts	1	1000,00	4919,80	4919800	67,98
		3	1000,00	2602,03	2602030	51,04
		5	1000,00	2339,02	2339020	35,81
		7	1000,00	1323,38	1323380	27,20
		9	1000,00	1487,43	1487430	17,52
		11	1000,00	536,65	536650	14,02
		13	1000,00	632,03	632030	12,61
		15	1000,00	397,03	397030	7,33
		17	1000,00	285,78	285780	5,46
		19	1000,00	184,77	184770	4,26
		21	1000,00	57,44	57440	3,89
		23	1000,00	70,91	70910	3,43
		25	1000,00	61,21	61210	3,03
		27	1000,00	60,48	60480	2,63
		29	1000,00	85,53	85530	2,08
		31	1000,00	69,03	69030	1,63
		33	1000,00	82,03	82030	1,09
		35	1000,00	63,78	63780	0,68
		37	1000,00	50,55	50550	0,35
		39	1000,00	53,82	53820	0,00
	4.9.03 links	1	1000,00	4691,70	4691700	78,94
		3	1000,00	7984,00	7984000	43,10
		5	1000,00	3041,85	3041850	29,44
		7	1000,00	2117,30	2117300	19,94
		9	1000,00	1531,35	1531350	13,06
		11	1000,00	502,45	502450	10,81
		13	1000,00	545,48	545480	3,94
		15	1000,00	316,93	316930	6,94
		17	1000,00	234,54	234540	5,88
		19	1000,00	227,04	227040	4,86
		21	1000,00	286,78	286780	3,58
		23	1000,00	199,85	199850	2,68
		25	1000,00	186,14	186140	1,84
		27	1000,00	170,55	170550	1,08
		29	1000,00	139,71	139710	0,45
		31	1000,00	100,54	100540	0,00
C01	21.11.01 rechts	Pool	18,00	155,99	2807,82	99,40
		1	552,00	293,68	162111,36	34,49
		2	580,00	142,30	82534	0,00

Phospholipide Einzelwerte

Patient	Lavagedatum, Lavageseite	Spülportion	Volumen (ml)	Konzentration (µg/ml)	Gesamtmenge je Spülportion (µg)	% gesamt (%)
J01	05.06.00 rechts	Pool	36	41,63	1498,68	97,86
		1	421	50,50	21260,50	67,51
		2	480	32,13	15420,00	45,50
		3	494	24,00	11856,00	28,57
		4	489	19,38	9474,38	15,05
		5	475	13,75	6531,25	5,73
		6	573	7,00	4011,00	0,00
	07.06.00 links	Pool	36	20,75	747,00	97,08
		1	474	19,50	9243,00	60,95
		2	472	16,75	7906,00	30,04
		3	490	4,38	2143,75	21,66
		4	488	8,13	3965,00	6,16
		5	486	2,50	1215,00	1,41
		6	480	0,75	360,00	0,00
	25.09.00 rechts	Pool	36	15,25	549,00	99,84
		1	458	294,53	134894,74	60,04
		2	475	216,45	102813,75	29,71
		3	490	58,58	28701,75	21,25
		4	475	71,60	34010,00	11,21
		5	512	26,97	13808,64	7,14
		6	487	27,92	13597,04	3,13
		7	510	20,79	10602,90	0,00
	27.09.00 links	Pool	36	15,74	566,64	99,58
		1	495	58,51	28962,45	78,07
		2	520	57,03	29655,60	56,05
		3	500	43,12	21560,00	40,05
		4	510	8,99	4584,90	36,64
		5	490	26,89	13176,10	26,86
		6	485	34,22	16596,70	14,53
		7	460	13,41	6168,60	9,95
		8	485	14,00	6790,00	4,91
		9	420	15,75	6615,00	0,00
J02	3.1.02 links	0	36	386,30	13906,80	99,40
		1	500	896,50	448250,00	80,00
		2	608	542,50	329840,00	65,72
		3	554	319,70	177113,80	58,05
		4	612	414,20	253490,40	47,08
		5	700	503,40	352380,00	31,83
		6	646	329,30	212727,80	22,62
		7	693	295,20	204573,60	13,77
		8	597	256,80	153309,60	7,13

		9	585	117,00	68445,00	4,17
		10	592	99,00	58608,00	1,63
		11	593	42,80	25380,40	0,53
		12	194	63,70	12357,80	0,00
	8.8.02 rechts	0	36	24,75	891,00	99,95
		1	540	1708,33	922498,20	44,95
		2	541	658,33	356156,53	23,72
		3	483	455,00	219765,00	10,61
		4	495	323,75	160256,25	1,06
		5	490	23,75	11637,50	0,37
		6	190	32,25	6127,50	0,00
	8.8.02 links	0	36	25,25	909,00	99,94
		1	485	1158,33	561790,05	60,41
		2	600	385,00	231000,00	44,16
		3	500	586,25	293125,00	23,54
		4	508	421,25	213995,00	8,48
		5	507	120,50	61093,50	4,18
		6	502	77,75	39030,50	1,44
		7	200	102,25	20450,00	0,00
	29.11.02 rechts	0	36	126,67	4560,12	99,30
		1	720	589,99	424792,80	34,13
		2	400	294,33	117732,00	16,07
		3	500	84,99	42495,00	9,55
		4	400	110,99	44396,00	2,74
		5	225	79,33	17849,25	0,00
	29.11.02 links	0	36	751,66	27059,76	98,38
		1	450	1276,65	574492,50	63,89
		2	600	939,99	563994,00	30,03
		3	600	313,33	187998,00	18,74
		4	555	174,99	97119,45	12,91
		5	600	162,67	97602,00	7,05
		6	590	134,99	79644,10	2,27
		7	420	89,99	37795,80	0,00
	12.3.03 links	0	36	672,50	24210,00	98,49
		1	530	1295,00	686350,00	55,62
		2	450	607,50	273375,00	38,54
		3	550	216,25	118937,50	31,11
		4	600	452,50	271500,00	14,15
		5	560	120,00	67200,00	9,96
		6	200	230,00	46000,00	7,08
		7	200	69,25	13850,00	6,22
		8	200	57,50	11500,00	5,50
		9	600	19,76	11856,00	4,76
		10	400	61,00	24400,00	3,23

		11	400	33,50	13400,00	2,40
		12	415	92,50	38387,50	0,00
	14.3.03 rechts	0	36	152,50	5490,00	99,83
		1	445	2800,00	1246000,00	61,03
		2	490	1700,00	833000,00	35,09
		3	500	537,50	268750,00	26,72
		4	450	367,50	165375,00	21,57
		5	495	387,50	191812,50	15,59
		6	490	71,75	35157,50	14,50
		7	290	235,00	68150,00	12,37
		8	100	527,50	52750,00	10,73
		9	100	480,00	48000,00	9,24
		10	100	302,50	30250,00	8,30
		11	90	205,00	18450,00	7,72
		12	85	445,00	37825,00	6,54
		13	485	111,25	53956,25	4,86
		14	490	75,00	36750,00	3,72
		15	490	69,50	34055,00	2,66
		16	480	96,50	46320,00	1,22
		17	565	44,50	25142,50	0,43
		18	100	38,25	3825,00	0,31
		19	120	83,75	10050,00	0,00
	17.3.03 links	0	36	23,50	846,00	99,68
		1	470	115,00	54050,00	79,03
		2	580	56,25	32625,00	66,57
		3	600	41,75	25050,00	57,00
		4	540	39,25	21195,00	48,90
		5	435	31,00	13485,00	43,75
		6	590	22,75	13422,50	38,63
		7	395	30,00	11850,00	34,10
		8	200	28,75	5750,00	31,90
		9	100	17,50	1750,00	31,23
		10	100	74,00	7400,00	28,41
		11	100	39,75	3975,00	26,89
		12	160	61,50	9840,00	23,13
		13	580	31,50	18270,00	16,15
		14	600	36,75	22050,00	7,73
		15	635	18,75	11906,25	3,18
		16	390	21,35	8326,50	0,00
J03	4.12.02 rechts	Pool	20,00	41,75	835,00	97,84
		1	114,50	171,88	19680,26	46,98
		2	96,00	189,38	18180,48	0,00
	5.12.02 links	Pool	19,00	71,75	1363,25	99,33
		1	39,00	121,25	4728,75	97,03
		2	59,00	233,75	13791,25	90,30

		3	37,00	63,13	2335,625	89,16
		4	42,00	1237,50	51975,00	63,79
		5	19,00	1043,75	19831,25	54,11
		6	34,00	1262,50	42925,00	33,17
		7	37,00	1212,50	44862,50	11,27
		8	24,00	962,50	23100,00	0,00
J04	7.12.01 rechts	Pool	15,00	1272,50	19087,50	94,08
		1	463,00	555,00	256965,00	14,40
		2	490,00	94,75	46427,50	0,00
	19.12.01 links	Pool	12,50	141,00	1762,50	98,07
		1	249,00	145,75	36291,75	58,41
		2	262,00	87,50	22925,00	33,35
		3	300,00	39,25	11775,00	20,48
		4	245,00	76,50	18742,50	0,00
A04	2.4.03 rechts	1	1000,00	1987,50	1987500	61,48
		2	1000,00	1262,50	1262500	37,00
		3	1000,00	435,00	435000	28,57
		4	1000,00	390,00	390000	21,01
		5	1000,00	395,00	395000	13,36
		6	1000,00	111,25	111250	11,20
		7	1000,00	91,75	91750	11,58
		8	1000,00	86,75	86750	7,74
		9	1000,00	68,50	68500	6,41
		10	1000,00	45,50	45500	5,53
		11	1000,00	36,00	36000	4,83
		12	1000,00	40,50	40500	4,05
		13	1000,00	31,00	31000	3,45
		14	1000,00	36,00	36000	2,75
		15	1000,00	42,50	42500	1,92
		16	1000,00	23,75	23750	1,46
		17	1000,00	8,60	8600	1,30
		18	1000,00	10,80	10800	1,09
		19	1000,00	9,73	9730	0,90
		20	1000,00	8,85	8850	0,73
		21	1000,00	6,60	6600	0,60
		22	1000,00	7,70	7700	0,45
		23	1000,00	7,55	7550	0,30
		24	1000,00	3,20	3200	0,24
		25	1000,00	4,10	4100	0,16
		26	1000,00	4,75	4750	0,07
		27	1000,00	3,65	3650	0,00
C01	21.11.01 rechts	Pool	18,00	82,75	1489,50	99,27
		1	552,00	121,25	66930,00	66,46
		2	580,00	233,75	135575,00	0,00

SP-A Einzelwerte

Patient	Lavagedatum, Lavageseite	Spülportion	Volumen (ml)	Konzentration (ng/ml)	Gesamtmenge je Spülportion (ng)	% gesamt (%)
J01	05.06.00 rechts	Pool	36	13989,00	503604,00	99,41
		1	421	80150,00	33743150,00	59,99
		2	480	39261,00	18845280,00	37,98
		3	494	22148,80	10941507,20	25,20
		4	489	14201,00	6944289,00	17,08
		5	475	14064,00	6680400,00	9,28
		6	573	13861,50	7942639,50	0,00
	07.06.00 links	Pool	36	13882,00	499752,00	98,18
		1	474	16679,30	7905988,20	69,32
		2	472	10180,30	4805101,60	51,78
		3	490	10205,20	5000548,00	33,53
		4	488	10239,90	4997071,20	15,29
		5	486	4670,90	2270057,40	7,01
		6	480	3999,70	1919856,00	0,00
	25.09.00 rechts	Pool	36	10920,80	393148,80	99,20
		1	458	29217,00	13381386,00	72,08
		2	475	11300,00	5367500,00	61,20
		3	490	12604,00	6175960,00	48,69
		4	475	10893,20	5174270,00	38,20
		5	512	2538,10	1299507,20	35,57
		6	487	31263,80	15225470,60	4,71
		7	510	4556,80	2323968,00	0,00
	27.09.00 links	Pool	36	21341,80	768304,80	99,62
		1	495	189603,90	93853930,50	52,95
		2	520	67758,00	35234160,00	35,43
		3	500	32438,00	16219000,00	27,37
		4	510	39791,00	20293410,00	17,27
		5	490	11323,00	5548270,00	14,52
		6	485	14047,00	6812795,00	11,13
		7	460	19680,00	9052800,00	6,63
		8	485	17752,60	8610011,00	2,35
		9	420	11230,30	4716726,00	0,00
	18.06.01 rechts	Pool	36	20901,50	752454,00	98,21
		1	540	30635,30	16543062,00	58,77
		2	520	13025,50	6773260,00	42,62
		3	435	7177,60	3122256,00	35,18
		4	480	6701,80	3216864,00	27,51
		5	590	14805,00	8734950,00	6,68
		6	420	6676,40	2804088,00	0,00
	20.06.01 links	Pool	36	17049,30	613774,80	98,16
		1	535	23585,00	12617975,00	60,29

		2	480	7995,90	3838032,00	48,77
		3	500	7611,00	3805500,00	37,35
		4	484	10786,40	5220617,60	21,68
		5	425	9767,90	4151357,50	9,22
		6	500	3800,00	1900000,00	3,52
		7	600	1952,90	1171740,00	0,00
J02	27.6.01 rechts	0	36	46922	1689192	99,91
		1	400	2708000	1083200000	39,10
		2	250	900339,2	225084800	26,46
		3	300	409081,6	122724480	19,57
		4	270	297245,86	80256382,2	15,07
		5	320	144295,6	46174592	12,48
		6	550	113318,3	62325065	8,98
		7	550	76968	42332400	6,60
		8	550	122768,8	67522840	2,81
		9	300	77014	23104200	1,51
		10	300	89855,3	26956590	0,00
	29.6.01 links	0	36	17331,1	623919,6	99,56
		1	485	36205	17559425	87,21
		2	500	25206,1	12603050	78,34
		3	508	95709,8	48620578,4	44,14
		4	495	81516,1	40350469,5	15,76
		5	500	52345	26172500	7,23
		6	500	47859,5	23929750	0,00
	8.8.02 rechts	0	36	63898,00	2300328	99,42
		1	540	530361,6	286395264	26,82
		2	541	117958,8	63815710,8	10,65
		3	483	55842,5	26971927,5	3,81
		4	495	9568,8	4736556	2,61
		5	490	6133	3005170	1,85
		6	190	38433	7302270	0,00
	8.8.02 links	0	36	845342,8	30432340,8	96,17
		1	485	722470,40	350398144	52,07
		2	600	390562,4	234337440	22,57
		3	500	126074,4	63037200	14,64
		4	508	109441,8	55596434,4	7,64
		5	507	66528,2	33729797,4	3,39
		6	502	41940,8	21054281,6	0,74
		7	200	29470,6	5894120	0,00
	29.11.02 rechts	0	36	298432,00	10743552	96,88
		1	720	11787	8486640	94,42
		2	400	263913,2	105565280	63,78
		3	500	220725	110362500	31,75
		4	400	147360	58944000	14,65

		5	225	224280	50463000	0,00
	29.11.02 links	0	36	1851000,00	66636000	96,07
		1	450	1822000	819900000	47,69
		2	600	639600	383760000	25,04
		3	600	279266,7	167560020	15,16
		4	555	210300	116716500	8,27
		5	600	99643,2	59785920	4,74
		6	590	66260,2	39093518	2,44
		7	420	98283,8	41279196	0,00
J03	4.12.02 rechts	Pool	20,00	26480,00	529600,00	94,13
		1	114,50	36495,30	4178711,85	47,78
		2	96,00	44874,00	4307904,00	0,00
	5.12.02 links	Pool	19,00	39878,00	757682,00	98,87
		1	39,00	41739,70	1627848,30	96,44
		2	59,00	134129,60	7913646,40	84,64
		3	37,00	165423,20	6120658,40	75,52
		4	42,00	505902,30	21247896,60	43,84
		5	19,00	369670,40	7023737,60	33,37
		6	34,00	254018,40	8636625,60	20,49
		7	37,00	319651,20	11827094,40	2,86
		8	24,00	79835,00	1916040,00	0,00
J04	7.12.01 rechts	Pool	15,00	536580,00	8048700,00	93,41
		1	463,00	169579,50	78515308,50	29,13
		2	490,00	72628,00	35587720,00	0,00
	19.12.01 links	Pool	12,50	41279,50	515993,75	98,15
		1	249,00	44749,00	11142501,00	58,23
		2	262,00	29959,80	7849467,60	30,11
		3	300,00	7183,90	2155170,00	22,39
		4	245,00	25502,20	6248039,00	0,00
C01	21.11.01 rechts	Pool	18,00	38942,00	700956,00	71,57
		1	552,00	56589,00	31237128,00	33,22
		2	580,00	85364,00	49511120,00	0,00

SP-D Einzelwerte

Patient	Lavagedatum, Lavageseite	Spülportion	Volumen (ml)	Konzentration (ng/ml)	Gesamtmenge je Spülportion (ng)	% gesamt (%)
J01	1.10.01 rechts	Pool	36	42,38	1525,68	97,03
		1	515	29,68	15285,20	67,28
		2	490	41,38	20276,20	27,81
		3	485	27,84	13502,40	1,53
		4	425	1,85	786,25	0,00
	05.06.00 rechts	Pool	36	19,26	693,36	99,23
		1	421	76,33	32134,93	63,31
		2	480	41,16	19756,80	41,23
		3	494	22,22	10976,68	28,96
		4	489	17,99	8797,11	19,13
		5	475	16,97	8060,75	10,12
		6	573	15,81	9059,13	0,00
	07.06.00 links	Pool	36	15,56	560,16	98,24
		1	474	18,49	8764,26	70,70
		2	472	14,45	6820,40	49,27
		3	490	16,04	7859,60	24,58
		4	488	7,76	3786,88	12,68
		5	486	5,29	2570,94	4,60
		6	480	3,05	1464,00	0,00
	11.12.00 rechts	Pool	36	5,26	189,36	99,53
		1	420	24,5	10290,00	74,06
		2	397	20,41	8102,77	54,01
		3	500	29,02	14510,00	18,10
		4	484	15,11	7313,24	0,00
	05.09.01 links	Pool	36	14,91	536,76	98,80
		1	495	15,82	7830,90	81,31
		2	510	33,01	16835,10	43,71
		3	500	3,97	1985,00	39,28
		4	590	5,25	3097,50	32,36
		5	585	7,98	4668,30	21,94
		6	488	8,29	4045,52	12,90
		7	585	1,85	1082,25	10,49
		8	485	5,75	2788,75	4,26
		9	490	3,89	1906,10	0,00
	25.09.00 rechts	Pool	36	51,31	1847,16	97,77
		1	458	32,69	14972,02	79,73
		2	475	28,2	13395,00	63,59
		3	490	14,98	7340,20	54,75
		4	475	34,79	16525,25	34,84
		5	512	25,49	13050,88	19,11
		6	487	21,71	10572,77	6,37

		7	510	10,37	5288,70	0,00
	27.09.00 links	Pool	36	46,41	1670,76	98,18
		1	495	35,94	17790,30	78,77
		2	520	23,89	12422,80	65,21
		3	500	20,37	10185,00	54,10
		4	510	18,4	9384,00	43,86
		5	490	15,79	7737,10	35,42
		6	485	15,8	7663,00	27,06
		7	460	21,89	10069,40	16,07
		8	485	18,28	8865,80	6,40
		9	420	13,96	5863,20	0,00
	18.06.01 rechts	Pool	36	17,73	638,28	99,22
		1	540	37,17	20071,80	74,75
		2	520	33,02	17170,40	53,82
		3	435	36,81	16012,35	34,30
		4	480	24,19	11611,20	20,15
		5	590	21,17	12490,30	4,93
		6	420	9,62	4040,40	0,00
	20.06.01 links	Pool	36	7,81	281,16	97,70
		1	535	7,26	3884,10	65,96
		2	480	3,8	1824,00	51,05
		3	500	2,6	1300,00	40,42
		4	484	4,56	2207,04	22,39
		5	425	3,12	1326,00	11,55
		6	500	1,59	795,00	5,05
		7	600	1,03	618,00	0,00
	6.11.00 rechts	Pool	36	43,55	1567,80	93,17
		1	420	19,77	8303,40	56,98
		3	590	12,82	7563,80	24,01
		5	580	8,17	4738,60	3,35
		7	185	4,16	769,60	0,00
	8.11.00 links	Pool	36	12,25	441,00	98,83
		1	502	28,75	14432,50	60,53
		3	569	1,61	916,09	58,10
		5	591	4,79	2830,89	50,59
		7	597	3,37	2011,89	45,25
		9	494	34,52	17052,88	0,00
J02	27.6.01 rechts	0	36	3,99	143,64	99,75
		1	400	21,85	8740,00	84,68
		2	250	24,51	6127,50	74,11
		3	300	33,50	10050,00	56,78
		4	270	17,77	4797,90	48,51
		5	320	18,25	5840,00	38,43

		6	550	21,05	11577,50	18,47
		7	550	8,11	4460,50	10,77
		8	550	3,99	2194,50	6,99
		9	300	6,26	1878,00	3,75
		10	300	7,25	2175,00	0,00
	29.6.01 links	0	36	23,65	851,40	98,65
		1	485	21,45	10403,25	82,10
		2	500	9,96	4980,00	74,18
		3	508	15,12	7680,96	61,96
		4	495	22,50	11137,50	44,24
		5	500	28,06	14030,00	21,93
		6	500	27,57	13785,00	0,00
	8.8.02 rechts	0	36	42,83	1541,88	98,30
		1	540	47,13	25450,20	70,22
		2	541	50,79	27477,39	39,90
		3	483	28,93	13973,19	24,48
		4	495	22,11	10944,45	12,41
		5	490	18,12	8878,80	2,61
		6	190	12,46	2367,40	0,00
	8.8.02 links	0	36	27,11	975,96	97,47
		1	485	13,15	6377,75	80,94
		2	600	16,16	9696,00	55,80
		3	500	15,25	7625,00	36,03
		4	508	8,37	4251,96	25,01
		5	507	8,37	4243,59	14,01
		6	502	7,57	3800,14	4,15
		7	200	8,01	1602,00	0,00
	29.11.02 rechts	0	36	19,84	714,24	97,95
		1	720	17,24	12412,80	62,25
		2	400	14,66	5864,00	45,39
		3	500	18,03	9015,00	19,47
		4	400	12,04	4816,00	5,62
		5	225	8,69	1955,25	0,00
	29.11.02 links	0	36	25,21	907,56	99,26
		1	450	46,58	20961,00	82,11
		2	600	41,16	24696,00	61,91
		3	600	32,46	19476,00	45,98
		4	555	26,70	14818,50	33,86
		5	600	24,92	14952,00	21,63
		6	590	25,38	14974,20	9,38
		7	420	27,29	11461,80	0,00
J03	4.12.02 rechts	Pool	20,00	10,71	214,20	97,26
		1	114,50	34,10	3904,45	47,26

		2	96,00	38,44	3690,24	0,00
	5.12.02 links	Pool	19,00	9,87	187,53	98,92
		1	39,00	23,50	916,50	93,66
		2	59,00	88,30	5209,70	63,76
		3	37,00	86,70	3207,90	45,34
		4	42,00	67,60	2839,20	29,04
		5	19,00	49,50	940,50	23,64
		6	34,00	52,60	1788,40	13,38
		7	37,00	35,80	1324,60	5,77
		8	24,00	41,90	1005,60	0,00
J04	7.12.01 rechts	Pool	15,00	19,91	298,65	97,68
		1	463,00	18,34	8491,42	31,76
		2	490,00	8,35	4091,50	0,00
	19.12.01 links	Pool	12,50	28,54	356,75	97,26
		1	249,00	21,40	5328,60	56,37
		2	262,00	10,43	2732,66	35,40
		3	300,00	4,99	1497,00	23,91
		4	245,00	12,72	3116,40	0,00
C01	21.11.01 rechts	Pool	18,00	4,73	85,14	99,80
		1	552,00	34,41	18768,00	34,49
		2	580,00	12,85	6960,00	0,00

Optische Dichte

Patient	Lavagedatum, Lavageseite	Spülportion	Volumen (ml)	Optische Dichte (405 nm)	Optische Dichte (540 nm)	Optische Dichte (650 nm)
J01	1.10.01 links	Pool	36	0,066	0,048	0,039
		1	540	0,089	0,063	0,048
		2	385	0,067	0,050	0,036
		3	490	0,049	0,039	0,033
		4	500	0,050	0,043	0,033
		5	490	0,042	0,039	0,030
		6	270	0,050	0,039	0,028
	1.10.01 rechts	Pool	36	0,052	0,038	0,028
		1	515	0,129	0,087	0,063
		2	490	0,080	0,060	0,044
		3	485	0,078	0,063	0,049
		4	425	0,049	0,041	0,031
	05.06.00 rechts	Pool	36	0,062	0,057	0,054
		1	421	0,277	0,187	0,067
		2	480	0,125	0,086	0,067
		3	494	0,058	0,044	0,036

		4	489	0,033	0,043	0,033
		5	475	0,046	0,036	0,031
		6	573	0,037	0,029	0,022
	07.06.00 links	Pool	36	0,127	0,072	0,050
		1	474	0,560	0,114	0,074
		2	472	0,184	0,103	0,058
		3	490	0,113	0,066	0,050
		4	488	0,060	0,048	0,039
		5	486	0,050	0,044	0,034
		6	480	0,046	0,046	0,033
	14.08.00 rechts	Pool	36	0,071	0,066	0,052
		1	457	0,352	0,267	0,186
		2	490	0,326	0,235	0,180
		3	492	0,155	0,114	0,096
		4	488	0,062	0,049	0,040
		5	462	0,056	0,045	0,035
		6	508	0,074	0,063	0,046
	11.12.00 rechts	Pool	36	0,037	0,030	0,023
		1	420	0,064	0,044	0,034
		2	397	0,138	0,095	0,073
		3	500	0,103	0,076	0,055
		4	484	0,031	0,028	0,019
	05.09.01 links	Pool	36	0,049	0,039	0,031
		1	495	0,167	0,115	0,088
		2	510	0,068	0,049	0,035
		3	500	0,044	0,037	0,026
		4	590	0,057	0,049	0,035
		5	585	0,052	0,040	0,027
		6	488	0,028	0,027	0,018
		7	585	0,031	0,028	0,020
		8	485	0,027	0,025	0,019
		9	490	0,030	0,027	0,022
	28.03.01 links	Pool	36	0,079	0,043	0,029
		1	500	0,069	0,050	0,039
		2	510	0,071	0,047	0,034
		3	550	0,038	0,030	0,020
		4	490	0,030	0,026	0,016
		5	585	0,018	0,018	0,013
		6	500	0,015	0,017	0,010
		7	695	0,009	0,010	0,007
		8	550	0,018	0,016	0,012
		9	560	0,012	0,014	0,009
		10	550	0,015	0,014	0,009
		11	490	0,011	0,013	0,008

		12	320	0,009	0,014	0,005
	16.08.00 links	Pool	36	0,343	0,238	0,181
		1	472	0,171	0,085	0,061
		2	471	0,113	0,085	0,065
		3	492	0,108	0,058	0,044
		4	485	0,063	0,046	0,045
		5	484	0,047	0,044	0,032
		6	479	0,037	0,033	0,024
		7	333	0,091	0,070	0,053
	25.09.00 rechts	Pool	36	0,081	0,068	0,049
		1	458	0,153	0,110	0,083
		2	475	0,084	0,063	0,047
		3	490	0,105	0,078	0,062
		4	475	0,090	0,071	0,054
		5	512	0,038	0,036	0,026
		6	487	0,142	0,107	0,080
		7	510	0,037	0,034	0,025
	27.09.00 links	Pool	36	0,080	0,074	0,069
		1	495	0,747	0,533	0,418
		2	520	0,526	0,374	0,299
		3	500	0,193	0,136	0,108
		4	510	0,244	0,188	0,149
		5	490	0,090	0,072	0,054
		6	485	0,113	0,090	0,068
		7	460	0,117	0,090	0,071
		8	485	0,091	0,073	0,056
		9	420	0,052	0,045	0,037
	07.05.01 rechts	Pool	36	0,062	0,053	0,041
		1	525	0,138	0,094	0,071
		2	500	0,098	0,073	0,053
		3	400	0,071	0,055	0,042
		4	500	0,063	0,052	0,041
		5	520	0,039	0,035	0,027
		6	585	0,040	0,031	0,022
		7	500	0,029	0,028	0,020
		8	310	0,032	0,029	0,019
	09.05.01 links	Pool	36	0,123	0,087	0,068
		1	492	0,109	0,072	0,046
		2	500	0,073	0,051	0,038
		3	500	0,066	0,049	0,035
		4	485	0,042	0,039	0,030
		5	490	0,039	0,031	0,021
		6	500	0,034	0,028	0,019
		7	390	0,026	0,023	0,017

		8	480	0,029	0,025	0,016
		9	460	0,027	0,030	0,023
		10	490	0,032	0,027	0,020
		11	590	0,022	0,021	0,015
	15.05.02 rechts	Pool	36	0,053	0,032	0,020
		1	545	0,146	0,075	0,049
		2	582	0,070	0,051	0,036
		3	537	0,051	0,037	0,030
		4	293	0,046	0,031	0,025
	18.06.01 rechts	Pool	36	0,059	0,045	0,035
		1	540	0,077	0,054	0,038
		2	520	0,047	0,033	0,023
		3	435	0,034	0,026	0,020
		4	480	0,030	0,026	0,018
		5	590	0,027	0,027	0,020
		6	420	0,024	0,021	0,014
	20.06.01 links	Pool	36	0,089	0,054	0,044
		1	535	0,092	0,062	0,044
		2	480	0,043	0,042	0,032
		3	500	0,031	0,028	0,020
		4	484	0,038	0,031	0,022
		5	425	0,038	0,028	0,021
		6	500	0,036	0,034	0,026
		7	600	0,024	0,025	0,020
	6.11.00 rechts	Pool	36	0,356	0,246	0,176
		1	420	0,114	0,082	0,064
		3	590	0,077	0,061	0,049
		5	580	0,048	0,042	0,035
		7	185	0,042	0,041	0,031
	8.11.00 links	Pool	36	0,084	0,072	0,056
		1	502	0,075	0,057	0,041
		3	569	0,080	0,066	0,049
		5	591	0,069	0,056	0,043
		7	597	0,056	0,051	0,042
		9	494	0,026	0,029	0,023
	8.5.00 rechts	Pool	36	0,058	0,053	0,048
		1	442	0,521	0,364	0,284
		2	500	0,177	0,129	0,098
		3	480	0,134	0,097	0,073
		4	495	0,054	0,049	0,040
		5	500	0,165	0,119	0,091
		6	500	0,093	0,072	0,056
		7	498	0,076	0,061	0,046

	24.1.00 rechts	Pool	36	0,052	0,038	0,028
		1	447	0,100	0,062	0,048
		2	403	0,111	0,075	0,057
		3	446	0,088	0,066	0,052
		4	183	0,210	0,147	0,111
J02	06.12.00 links	0	36	0,424	0,291	0,219
		1	512	1,648	1,238	1,009
		2	439	1,169	0,867	0,685
		3	490	0,363	0,267	0,205
		4	430	0,783	0,574	0,436
		5	208	0,621	0,448	0,330
	11.12.00 links	0	36	0,345	0,217	0,158
		1	481	1,047	0,672	0,501
		2	493	0,433	0,304	0,227
		3	580	0,304	0,220	0,163
		4	461	0,550	0,403	0,293
		5	428	0,279	0,199	0,141
		6	412	0,246	0,193	0,135
		7	205	0,242	0,184	0,131
	22.02.01 rechts	0	36	0,339	0,213	0,164
		1	466	1,849	1,466	1,216
		2	483	0,175	0,124	0,094
		3	572	0,206	0,142	0,106
		4	529	0,717	0,494	0,366
		5	540	0,229	0,166	0,120
		6	472	0,138	0,103	0,074
		7	305	0,210	0,153	0,113
	27.6.01 rechts	0	36	0,083	0,066	0,051
		1	400	2,456	2,109	1,908
		2	250	1,507	1,128	0,902
		3	300	1,099	0,790	0,603
		4	270	1,029	0,747	0,568
		5	320	0,497	0,344	0,258
		6	550	0,470	0,328	0,246
		7	550	0,381	0,272	0,205
		8	550	0,388	0,270	0,204
		9	300	0,201	0,146	0,111
		10	300	0,259	0,183	0,139
	29.6.01 links	0	36	1,208	0,907	0,716
		1	485	2,065	1,702	1,443
		2	500	1,023	0,710	0,541
		3	508	0,432	0,309	0,225
		4	495	0,291	0,208	0,152

		5	500	0,193	0,139	0,097
		6	500	0,154	0,114	0,079
	3.1.02 links	0	36	2,293	1,916	1,680
		1	500	2,429	2,101	1,898
		2	608	1,675	1,322	1,102
		3	554	0,710	0,511	0,384
		4	612	0,578	0,420	0,325
		5	700	0,325	0,238	0,179
		6	646	0,198	0,146	0,109
		7	693	0,152	0,115	0,087
		8	597	0,154	0,118	0,089
		9	585	0,097	0,075	0,058
		10	592	0,089	0,071	0,056
		11	593	0,057	0,049	0,040
		12	194	0,064	0,050	0,044
	7.1.02 rechts	0	36	1,559	1,177	0,959
		1	170	2,682	2,202	1,951
		2	590	2,010	1,619	1,393
		3	425	0,736	0,501	0,370
		4	445	0,487	0,337	0,248
		5	450	0,204	0,139	0,103
		6	450	0,368	0,254	0,181
		7	475	0,232	0,168	0,124
		8	600	0,367	0,256	0,198
		9	565	0,286	0,195	0,149
		10	420	0,213	0,149	0,115
	28.2.02 rechts	0	36	0,344	0,237	0,183
		1	170	0,813	0,557	0,423
		2	590	0,488	0,322	0,234
		3	425	0,467	0,315	0,234
		4	445	0,127	0,096	0,069
		5	450	0,223	0,152	0,108
		6	450	0,111	0,083	0,061
		7	435	0,112	0,088	0,067
		8	320	0,248	0,178	0,134
	8.8.02 rechts	0	36	0,177	0,126	0,096
		1	540	1,686	1,335	1,111
		2	541	0,712	0,424	0,307
		3	483	0,458	0,267	0,193
		4	495	0,134	0,090	0,066
		5	490	0,064	0,049	0,034
		6	190	0,079	0,057	0,041
	8.8.02 links	0	36	0,134	0,094	0,072
		1	485	1,340	1,001	0,817

		2	600	0,598	0,419	0,333
		3	500	0,276	0,184	0,132
		4	508	0,235	0,173	0,134
		5	507	0,159	0,110	0,077
		6	502	0,107	0,084	0,065
		7	200	0,130	0,100	0,076
	29.11.02 rechts	0	36	0,127	0,103	0,082
		1	720	1,417	1,095	0,922
		2	400	0,818	0,569	0,447
		3	500	0,389	0,277	0,225
		4	400	0,313	0,227	0,179
		5	225	0,451	0,320	0,248

VI.C. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Griesse ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung, die hilfreichen Anregungen und Hilfestellungen und die viele Zeit, die er für mich aufgebracht hat.

Besonders herzlich möchte ich mich bei unserer leitenden CTA Frau Andrea Schams für ihre Geduld und ausgiebige, kompetente Unterstützung bei sämtlichen labortechnischen Auswertungen und Methoden bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Markus Woitschnik für seine Hilfestellung in Computerangelegenheiten und ausgiebigen Diskussionen danken.

Bei meinen Mitdoktoranden Eva Bielecki, Eva Brack, Robert Essl, Dominik Hartl, Valerie Kirchberger, Philip Latzin, Farhad Schabaz, Vitaly Starosta, Oliver Tafel, Maria Wassilewa, Katinka Weckerle, Tobias Winter und unseren technischen Assistentinnen Stefanie Gruschka, Marietta Demmeler und Yvonne Wüst möchte ich mich für Ihre Hilfestellungen und die vielen netten Stunden im Labor bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Klinikdirektoren und Klinikärzten, die mir freundlicherweise Probenmaterial und klinische Informationen über die betroffenen Patienten haben zukommen lassen.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern und meiner Freundin Asli Pamir danken, deren Motivation und Unterstützung einen sehr großen Teil zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

VI.D. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Christian Peter Paschen
Geboren: 09.08.1975 in München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Blumenburgstraße 96a
80636 München
Telefon: 089/12779966
E-Mail: christian-paschen@t-online.de

PROMOTION

07/2002 – 12/2004: Ludwig-Maximilians-Universität München
Promotion

- Dissertation: „Surfactantproteine bei Pulmonaler Alveolarproteinose“
- Doktorvater: Prof. Dr. Matthias Grieser
Dr. von Haunersches Kinderspital

STUDIUM

10/2002 – 10/2004 Universität Bayreuth
Praktischer Betriebswirt für die Pharmazie

- Studiengang Praktischer Betriebswirt für die Pharmazie

11/1996 – 07/2002 Ludwig-Maximilians-Universität München
Pharmaziestudium

- Approbation als Apotheker 07/2002

PRAKTIKA

11/2001 – 04/2002 Städtisches Krankenhaus München Harlaching
04/2001 – 10/2001 Lachner Apotheke München

ENGAGEMENT

Seit 8/2003 Beratung der Nibelungenapotheke München in den Bereichen
Betriebswirtschaft, Marketing, EDV

ERSATZDIENST

09/1995 – 10/1996 GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit München
Zivildienst

- Abteilung: Retrovirale Pathogenese
- Labortätigkeiten

SCHULAUSBILDUNG

9/1986 – 7/1995 Obermenzinger Gymnasium / Albert-Einstein-Gymnasium München
Abitur

- Leistungskurse: Englisch, Wirtschaft/Recht
- Allgemeine Hochschulreife: Abschluß 1,8

SPRACHKENNTNISSE

Englisch fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse